रजिस्ट्री सं. डी.एल.- 33004/99 REGD. No. D. L.-33004/99

भारत का राजपत्र
The Gazette of India

सी.जी.-डी.एल.-अ.-06102025-266713
CG-DL-E-06102025-266713

असाधारण
EXTRAORDINARY

भाग II—खण्ड 3—उप-खण्ड (ii)
PART II—Section 3—Sub-section (ii)

प्राधिकार से प्रकाशित
PUBLISHED BY AUTHORITY

सं. 4405] नई दिल्ली, सोमवार, अक्तूबर 6, 2025/आश्विन 14, 1947
No. 4405] NEW DELHI, MONDAY, OCTOBER 6, 2025/ASVINA 14, 1947

कृषि एवं किसान कल्याण मंत्रालय

(कृषि एवं किसान कल्याण विभाग)

आदेश

नई दिल्ली, 30 सितम्बर, 2025

का. आ. 4533(अ).— केन्द्रीय सरकार, आवश्यक वस्तु अधिनियम, 1955 (1955 का 10) की धारा 3 द्वारा प्रदत्त शक्तियों का प्रयोग करते हुए उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) आदेश, 1985 का और संशोधन करने के लिए निम्नलिखित आदेश करती है, अर्थात:-

1. (1) इस आदेश का संक्षिप्त नाम उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) ग्यारहवाँ संशोधन आदेश, 2025 है।

(2) यह राजपत्र में प्रकाशन की तारीख से प्रवृत्त होगा।

2. उर्वरक (अकार्बनिक, कार्बनिक या मिश्रित) (नियंत्रण) आदेश, 1985 में, अनुसूची VI में, भाग घ "परीक्षण की कार्यपद्धति" में, उपशीर्षक 32, "आर्सेनिक का अवधारण" के पश्चात्, निम्नलिखित मदें और प्रविष्टियां रखी जाएंगी, अर्थात:-

"33. एचपीएलसी द्वारा सैलिसिलिक एसिड का अवधारण -

33.1 उपकरण-

(क) रिवर्स फेज़ सी-18 कॉलम (250 मिमी × 4.6 मिमी x 5 माइक्रोंन)

(ख) यूवी डिटेक्टर

(ग) ऐनालिटिकल बैलेंस

(घ) 0.22 माइक्रोंन सिरिंज फ़िल्टर

33.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी-

(क) एसीटोनिट्राइल (एचपीएलसी ग्रेड, सीएएस नं. 75-05-8)

(ख) ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड (सीएएस नं. 7664-38-2)

(ग) सैलिसिलिक एसिड (सीएएस नं. 69-72-7)

(घ) जल (एचपीएलसी ग्रेड)

(ङ) मोबाइल फेज की तैयारी: एसीटोनिट्राइल और जल (0.1% ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड के साथ) को 50:50 वी/वी के अनुपात में लें, इसे 5 मिनट के लिए सोनिकेट करें और उपयोग से पहले विलयन को वैक्यूम फ़िल्टर करें और डीगैस करें।

(च) सैलिसिलिक एसिड मानक के स्टॉक विलयन की तैयारी: 10 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में सैलिसिलिक एसिड (10 मिलीग्राम) लें, फ्लास्क में 7 मिली लीटर मोबाइल फेज डालें, 10 मिनट तक सोनिकेट करें, मोबाइल फेज के साथ आयतन 10 मिली लीटर करें, इस प्रक्रिया से 1000 पीपीएम का स्टॉक विलयन प्राप्त होता है।

(छ) सैलिसिलिक एसिड के कार्यशील विलयन की तैयारी: 1.0 मिली लीटर स्टॉक मानक को मोबाइल फेज के साथ 10 मिली लीटर तक तनु करें और अच्छी तरह मिलाएँ, इससे 100 पीपीएम का कार्यशील मानक विलयन प्राप्त होता है, 1.0 मिली लीटर कार्यशील मानक विलयन को मोबाइल फेज के साथ 10 मिली लीटर तक पतला करें, इससे 10 पीपीएम का प्रायोगिक मानक विलयन प्राप्त होता है, निम्न तालिका यथाविनिर्दिष्ट कैलिब्रेशन वक्र तैयार करें:-

तालिका

क्र.सं.	रैखिकता मानक	स्टॉक विलयन की सांद्रता (पीपीएम)	उपयोग किए जाने वाले स्टॉक विलयन का आयतन (मि. ली.)	प्रयोग किए जाने वाले जल का आयतन (मि. ली.)	मानक की सांद्रता (माइक्रो ग्राम/मि. ली.)
(i)	मानक 1	10 पीपीएम	0.10	0.90	1
(ii)	मानक 2	10 पीपीएम	0.50	0.50	5
(iii)	मानक 3	10 पीपीएम	1.0	0.00	10
(iv)	मानक 4	100 पीपीएम	0.25	0.75	25
(v)	मानक 5	100 पीपीएम	0.50	0.50	50
(vi)	मानक 6	100 पीपीएम	1.0	0.00	100

(ज) नमूना विलयन की तैयारी:-

(i) नमूना लेने से पहले उत्पाद को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं;

(ii) तरल उत्पादों के लिए, 50 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में उत्पाद का 0.5 से 5 ग्राम (±10%) सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें;

(iii) पाउडर उत्पादों के लिए, जिनके पुनर्गठन की आवश्यकता नहीं है, 50 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पाउडर का सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें;

(iv) 50 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 से 15 मिली मोबाइल फेज़ डालें और पाउडर को पूर्ण रूप से घुलने तक घुमाएं या हिलाएं; पाउडर उत्पादों के लिए जो उप-ग्राम स्तर पर सजातीय नहीं हैं, उत्पाद लेबल अनुदेशों का पालन करते हुए पुनर्गठित करें और 50 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पुनर्गठित उत्पाद का सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें;

(v) मोबाइल फेज़ के साथ आयतन को 50 मिली लीटर तक बनाएं;

(vi) इसे तीस मिनट तक सोनिकेट करें और 0.22माइक्रोंन सिरिंज फिल्टर से छान लें; और

(vii) विश्लेषण के लिए एचपीएलसी-यूवी सिस्टम में 10 माइक्रोलीटर इंजेक्ट करें।

33.3 प्रक्रिया-

निम्न तालिका में यथानिर्दिष्ट एचपीएलसी स्थितियों का पालन करते हुए विश्लेषण करें-

तालिका

(i)	कॉलम	सी-18 (250 मिली मीटर x 4.6 मिली मीटर x 5 माइक्रोंन)
(ii)	डिटेक्टर	यूवी
(iii)	डिटेक्टर वेवलेंथ	237 नैनो मीटर
(iv)	प्रवाह दर	1.0 मिली लीटर/मिनट
(v)	कॉलम तापमान	40 डिग्री सेल्सियस
(vi)	मोबाइल फेज	एसीटोनिट्राइल का उपयोग करके मोबाइल फेज के साथ आइसोक्रेटिक निक्षालन: 0.1% ऑर्थोफॉस्फोरिक एसिड के साथ जल (50: 50 वी/वी)
(vii)	रन टाइम	50 मिनट
(viii)	इनजेक्शन आयतन	10 माइक्रोलीटर

33.4 संगणना-

$$\text{सैलिसिलिक एसिड (मिली ग्राम/किलो ग्राम)} = \frac{\text{नमूना क्षेत्रफल x मानक सांद्रता x विलयन}}{\text{मानक क्षेत्रफल x नमूना वजन}}$$

33.5 संदर्भ-

कोवाल्स्का एम, वोज़्नियाक एम, किजेक एम, मिट्रोज़ पी, स्ज़ाकील जे, ट्यूरेक पी. एक नए दवा उत्पाद में एसिटाइलसैलिसिलिक एसिड की अशुद्धियों के अवधारण के लिए एचपीएलसी पद्धति का सत्यापन प्रबंधन, साइंटिफिक रिपोर्ट्स 2022 जनवरी 6;12 (1):1।

34. एचपीएलसी द्वारा साइटोकाइनिन का अवधारण -

34.1 उपकरण-

(क) रिवर्स फेज़ सी-18 कॉलम (250 मिमी × 4.6 मिमी x 5 माइक्रोंन)

(ख) यूवी डिटेक्टर

(ग) ऐनालिटिकल बैलेंस

(घ) 0.22 माइक्रोंन सिरिंज फ़िल्टर

34.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी-

(क) एसीटोनिट्राइल (एचपीएलसी ग्रेड, सीएएस नं. 75-05-8)

(ख) जल (एचपीएलसी ग्रेड)

(ग) मेथनॉल (एचपीएलसी ग्रेड, सीएएस न. 67-56-1)

(घ) मोबाइल फेज की तैयारी.-

सॉलवेंट ए - मेथनॉल: जल: ग्लेशियल एसिटिक एसिड (*50:450:*1, वी/वी/वी*);* और
सॉलवेंट बी - मेथनॉल: ग्लेशियल एसिटिक एसिड (*500: 1*, वी/वी*)*

(ङ) जिएटिन के मानक स्टॉक विलयन की तैयारी: 10 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 10 मिलीग्राम जिएटिन लें, इसमें 1 मिली लीटर 0.1N सोडियम हाइड्रोक्साइड मिलाएं और सोनिकेशन से घोलें, मेथनॉल का उपयोग करके आयतन 10 मिली लीटर तक बनाएं, इससे 1000 पीपीएम का स्टॉक विलयन प्राप्त होता है।

(च) जिएटिन के कार्यशील विलयन की तैयारी :1.0 मिली स्टॉक मानक को मेथनॉल के साथ 10 मिली तक तनु करें और अच्छी तरह से मिलाएं, यह 100 पीपीएम का एक मध्यवर्ती मानक विलयन देता है, मोबाइल फेज के साथ 1.0 मिली मध्यवर्ती मानक विलयन को 10 मिली तक तनु करें, यह 10 पीपीएम का एक मध्यवर्ती मानक विलयन देता है, निम्न तालिका में यथानिर्दिष्ट विवरणों के अनुसार कैलिब्रेशन वक्र तैयार करें:-

तालिका

क्र.सं.	रैखिकता मानक	स्टॉक विलयन की सांद्रता (पीपीएम)	प्रयोग किए जाने वाले स्टॉक विलयन का आयतन (मिली लीटर)	प्रयोग किए जाने वाले मेथनॉल का आयतन (मिली लीटर)	मानक की सांद्रता (माइक्रो ग्राम/मिली लीटर)
(i)	मानक 1	10 पीपीएम	0.50	0.50	5
(ii)	मानक 2	10 पीपीएम	1.0	0.00	10
(iii)	मानक 3	100 पीपीएम	0.5	0.50	50
(iv)	मानक 4	100 पीपीएम	1.0	0.00	100
(v)	मानक 5	1000 पीपीएम	0.2	0.80	200
(vi)	मानक 6	100 पीपीएम	0.4	0.60	400

(छ) नमूना विलयन की तैयारी-

(i) नमूना लेने से पहले उत्पाद को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं;

(ii) तरल उत्पाद के लिए, 50 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में उत्पाद का 0.5 से 5 ग्राम (±10%) सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें;

(iii) पाउडर उत्पाद, जिन्हें पुनर्गठन की आवश्यकता नहीं है, 50 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पाउडर सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें;

(iv) 50 मिली लीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में लगभग 10 से 15 मिली मोबाइल फेज़ डालें और पाउडर को पूरी तरह से घुलने तक घुमाएं या हिलाएं; पाउडर उत्पादों के लिए जो उप-ग्राम स्तर पर सजातीय नहीं हैं, उत्पाद लेबल अनुदेशों का पालन करते हुए पुनर्गठित करें और 50 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 1.0 ग्राम पुनर्गठित उत्पाद का सटीक वजन लें और वजन को निकटतम 0.0001 ग्राम तक रिकॉर्ड करें;

(v) मोबाइल फेज़ के साथ आयतन को 50 मिली लीटर तक बनाएँ;

(vi) इसे तीस मिनट तक सोनिकेट करें और 0.22माइक्रोंन सिरिंज फिल्टर से छान लें; और

(vii) विश्लेषण के लिए एचपीएलसी-यूवी प्रणाली में 10माइक्रोलीटर इंजेक्ट करें।

34.3 प्रक्रिया-

(क) प्रारंभ में कॉलम को 80% सॉलवेंट ए और 20% सॉलवेंट बी के मिश्रण के साथ अनुकूलित करें, यौगिकों (कम्पाउन्ड्स) को एचपीएलसी स्थितियों में दिए गए सॉलवेंट प्रणाली का उपयोग करके

मेथनॉल सांद्रता को शून्य से बीस मिनट (20% बी+ 80% ए) से (45% बी+ 55% ए), बीस से बाईस मिनट (45% बी + 55% ए), बाईस से तीस मिनट (45% बी + 55% ए) से (60% बी + 40% ए), तीस से चालीस मिनट (60% बी से 40% ए) तक बढ़ाने के ग्रेडिएंट एल्यूशन के साथ निक्षालन करें; और

(ख) एचपीएलसी स्थितियां: निम्न तालिका में यथानिर्दिष्ट एचपीएलसी प्रचालन स्थितियों का पालन करते हुए एचपीएलसी विश्लेषण करें:

तालिका

(i)	कॉलम	सी18 (250 मिली मीटर x 4.6 मिली मीटर x 5 माइक्रोंन)
(ii)	डिटेक्टर	यूवी
(iii)	डिटेक्ट करने के लिए वेवलेंथ	269 नैनो मीटर
(iv)	प्रवाह दर	0.5 मिली लीटर/मिनट
(v)	कॉलम तापमान	30 डिग्री सेल्सियस
(vi)	मोबाइल फेज	*विलायक* A- *मेथनॉल: जल: ग्लेशियल एसिटिक अम्ल (50:450:* l, *वी /वी /वी)* *विलायक* B- *मेथनॉल: ग्लेशियल एसिटिक एसिड (500: 1, वी /वी)*
(vii)	रन टाइम	40 मिनट
(viii)	इनजेक्शन आयतन	20 माइक्रोलीटर

34.4 गणना-

$$\text{साइटोकिनिन (मिली ग्राम/किलो ग्राम)} = \frac{\text{नमूना क्षेत्रफल x मानक सांद्रता x विलयन}}{\text{मानक क्षेत्रफल x नमूना वजन}}$$

34.5 संदर्भ-

क्यूई, बी.; वू, सी.; लियांग, एच.; कुई, के.; फहद, एस.; वांग, एम.; लियू, बी.; नी, एल.; हुआंग, जे.; टैंग, एच. नौ साइटोकाइनिन, इंडोल-3-एसिटिक एसिड और एब्सिसिक एसिड के अवधारण के लिए अनुकूलित उच्च-प्रदर्शन तरल क्रोमैटोग्राफी पद्धति। सस्टेनेबिलिटी **2021**, 13, 6998 ।

35. कार्बोहाइड्रेट या सैकराइड्स का अवधारण -

35.1 उपकरण-

(क) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
(ख) वोर्टेक्स मिक्सर
(ग) हीटिंग मेंटल/वाटर बाथ
(घ) बैलेंस

35.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी-

(क) एंथ्रोन (सीएएस न. 90-44-8)
(ख) सान्द्र हाइड्रोक्लोरिक एसिड (सीएएस न. 7647-01-0)
(ग) सान्द्र सल्फ्यूरिक एसिड (सीएएस न. 7664-93-9)
(घ) 2.5N हाइड्रोक्लोराइड: 208.3 मिलीलीटर सांद्र हाइड्रोक्लोरिक एसिड लें और जल के साथ 1000 मिली लीटर तक आयतन पूरा करें।
(ङ) एंथ्रोन अभिकर्मक: 200 मिलीग्राम एंथ्रोन को 100 मिलीलीटर आइस-कोल्ड सांद्र सल्फ्यूरिक एसिड में घोलें, उपयोग से पहले ताज़ा तैयार करें।

(च) मानक ग्लूकोज़ स्टॉक : 100 मिलीग्राम ग्लूकोज़ को 100 मिलीलीटर जल में घोलें, इससे 1000 मिलीग्राम/मिली ग्लूकोज़ विलयन तैयार होता है।

(छ) कार्यशील मानक: आसुत जल के साथ 10 मिली लीटर ग्लूकोज़ स्टॉक विलयन को 100 मिली लीटर तक तनु करें, यह 100 मिली ग्राम/मिली लीटर का कार्यशील मानक देता है, टोल्यून की कुछ बूंदें डालने के बाद इसे रेफ्रिजरेट करके रखें।

टिप्पण : *आइस-कोल्ड एंथ्रोन अभिकर्मक डालने से पहले सभी ट्यूबों की सामग्री को बर्फ पर ठंडा कर लें।*

35.3 प्रक्रिया-

(क) 100 मिली ग्राम सैंपल को उबलते ट्यूब में तौलें;

(ख) इसे 5 मिली लीटर 2.5एन हाइड्रोक्लोरिक एसिड के साथ उबलते वाटरबाथ में 3 घंटे तक रखकर हाइड्रोलाइज़ करें और कमरे के तापमान तक ठंडा करें;

(ग) बुदबुदाहट बंद होने तक ठोस सोडियम कार्बोनेट के साथ इसे उदासीन करें;

(घ) आयतन को 100 मिलीलीटर तक बनाएं और सेंट्रीफ्यूग करें;

(ङ) सतह पर तैरने वाला पदार्थ एकत्र करें और विश्लेषण के लिए 0.5 मिलीलीटर और 1 मिलीलीटर अंश लें;

(च) कार्यशील मानक के 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 और 1 मिली लीटर लेकर मानक तैयार करें, '0' शून्य को दर्शाता है।

(छ) आसुत जल डालकर नमूना ट्यूब सहित सभी ट्यूब्स में आयतन को 1 मिली लीटर तक बनाएं;

(ज) 4 मिली लीटर आइस-कोल्ड एंथ्रोन अभिकर्मक मिलाएं;

(झ) उबलते जल में आठ मिनट तक गर्म करें;

(ञ) बर्फ पर तेजी से ठंडा करें और 630 नैनो मीटर पर पर हरा से गहरा हरा रंग होने तक रीडिंग लें;

(ट) एक्स-अक्ष पर मानक सांद्रता बनाम वाई-अक्ष पर अवशोषण को आलेखित करके एक मानक ग्राफ बनाएं; और

(ठ) ग्राफ से सैंपल ट्यूब में विद्यमान कार्बोहाइड्रेट की मात्रा की संगणना करें।

35.4 गणना-

कार्बोहाइड्रेट की मात्रा (100 मिली ग्राम नमुने में)	=	(ग्लूकोस का मिली ग्राम ÷ परिक्षण नमूने का आयतन) x 100

35.5 संदर्भ-

हेज, जेई और होफ्रेइटर बीटी (1962) इन: कार्बोहाइड्रेट केमिस्ट्री 17 (संपादक व्हिस्लर आर एल और बी मिलर, जे एन) अकादमिक प्रेस न्यूयॉर्क।

36. स्टार्च का अवधारण.-

36.1 उपकरण-

(क) वाटर बाथ

(ख) हाई स्पीड सेंट्रिफ्यूग

(ग) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर

(घ) ऐनालिटिकल बैलेंस

36.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी-

(क) इथेनॉल 95%- 95 मिली लीटर शुद्ध इथेनॉल में 5 मिली लीटर जल मिलाएं
(ख) सान्द्र परक्लोरिक एसिड
(ग) सान्द्र सल्फ्यूरिक एसिड

36.3 प्रक्रिया-

(क) शुगर को हटाने के लिए नमूने के 0.1 से 0.5 ग्राम को गर्म 80% इथेनॉल में समरूपित करें, सेंट्रिफ्यूग करें और अवशेष को रोककर रखें, अवशेष को गर्म 80% इथेनॉल से बार-बार तब तक धोएँ जब तक कि धोने पर एंथ्रोन अभिकर्मक से रंग न आ जाए, अवशेष को वाटर बाथ में अच्छी तरह सुखाएँ;
(ख) अवशेष में 5.0 मिली लीटर जल और 6.5 मिली लीटर 52% परक्लोरिक एसिड मिलाएं;
(ग) 0 डिग्री सेल्सियस पर 20 मिनट तक निष्कर्षण करें, सेंट्रिफ्यूग करें और सतह पर तैरने वाले पदार्थ को सुरक्षित रखें;
(घ) ताज़ा परक्लोरिक एसिड का उपयोग करके निष्कर्षण (एक्सट्रैक्शन) दोहराएं, सेंट्रिफ्यूग करें और सतह पर तैरने वाले पदार्थ को जमा करें और 100 मिली लीटर तक तैयार करें;
(ङ) सतह पर तैरने वाले पदार्थ के 0.1 मिलीलीटर या 0.2 मिलीलीटर को पिपेट से बाहर निकालें और जल के साथ आयतन को 1 मिली लीटर तक बनाएँ; और
(च) एंथ्रोन अभिकर्मक का उपयोग करके अपचायक शर्करा के विश्लेषण के लिए आगे बढ़ें, जैसा कि उप-शीर्षक 35 में कार्बोहाइड्रेट या सैकराइड के अवधारण में वर्णित है।

36.4 संगणना-

मानक ग्राफ का उपयोग करके नमूने में ग्लूकोज की मात्रा ज्ञात करें, स्टार्च की मात्रा ज्ञात करने के लिए मान को 0.9 से गुणा करें।

36.5 संदर्भ-

हॉज जेई और होफ्रेइटर बीटी 1962. इन: मेथड्स इन कार्बोहाइड्रेट केमिस्ट्री (संपादक व्हिस्लर आरएल और बी मिलर जेएन) एकेडमिक प्रेस न्यूयॉर्क।

37. सेल्यूलेज कर्यलाप का अवधारण -

37.1 उपकरण-

(क) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर
(ख) वाटर बाथ
(ग) ऐनालिटिकल बैलेंस

37.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी-

(क) कार्बोक्सी मिथाइल सेलुलोज़ (सीएएस न. 9004-32-4)
(ख) डाइनाइट्रोसैलिसाइक्लिक एसिड (सीएएस न. 609-99-4)
(ग) फिनोल (सीएएस न. 108-95-2)
(घ) सोडियम सल्फाइट (सीएएस न. 7757-83-7)
(ङ) रोशेल सॉल्ट (पोटेशियम सोडियम टार्टरिट) (सीएएस न. 6381-59-5)
(च) साइट्रिक एसिड मोनोहाइड्रेट (सीएएस न. 5949-29-1)
(छ) साइट्रेट बफर: 750 मिली लीटर आसुत जल में साइट्रिक एसिड मोनोहाइड्रेट (210 ग्राम) घोलें, सोडियम हाइड्रॉक्साइड का उपयोग करके पीएच को 4.3 पर समायोजित करें, आयतन को 1000 मिलीलीटर बनाएं और पीएच को 4.5 पर समायोजित करने के लिए सोडियम हाइड्रॉक्साइड डालें, यह 1एम साइट्रेट बफर (पीएच 4.5) देता है, अब 1एम साइट्रेट बफर का 5 मिली लीटर लें, 90 मिलीलीटर डिस्टिल्ड जल मिलाएँ और सोडियम हाइड्रॉक्साइड का उपयोग करके पीएच को 4.8

पर समायोजित करें, आसुत जल के साथ आयतन को 100 मिलीलीटर करें, यह 0.05एम साइट्रेट बफर (पीएच 4.8) का विलयन देता है।

(ज) डाइनाइट्रोसैलिसिलिक एसिड (डीएनएसए) स्टॉक विलयन: इसमें विलयन ए और विलयन बी सम्मिलित हैं जैसा कि नीचे दिया गया है-
  (i) विलयन ए: 1000 मिलीलीटर जल में 10 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साइड घोलें, अच्छी तरह से मिलाएं और इससे 1% सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन प्राप्त होगा; और
  (ii) विलयन बी: विलयन ए में 200 मिलीग्राम पोटेशीयम-सोडियम टार्टरिट, 2 ग्राम क्रिस्टलीय फिनोल और 10 ग्राम डीएनएस मिलाएं, बीकर को हीटर/स्टिरर पर रखें और धीरे-धीरे गर्म करें, हिलाते हुए, घुलने तक, कमरे के तापमान तक ठंडा करें और विलयन को 4°से. पर एम्बर रंग की बोतलों में संग्रहित करें।

(झ) डीएनएसए. कार्यशील विलयन: 99 मिली स्टॉक डीएनएसए में 1 मिली 5% सोडियम सल्फाइट डालें और अच्छी तरह मिलाएं;

(ञ) सब्सट्रेट तैयार करना: 2 ग्राम कार्बोक्सिमिथाइल सेलुलोज (सीएमसी) तौलें और इसे 100 मिली 0.05एम साइट्रेट बफर (पीएच 4.8) में घोलें, अच्छी तरह विलयन बनाने के लिए मिश्रण को अच्छी तरह हिलाएं और यदि आवश्यक हो, तो घुलने में आसानी के लिए विलयन को मध्यम तापमान (जैसे, 60 °से.) तक गर्म करें;

(ट) ग्लूकोज मानक स्टॉक विलयन: 100 मिली जल में 100 मिलीग्राम ग्लूकोज घोलें और यह 1 मिलीग्राम/मिली का स्टॉक देता है;

(ठ) ग्लूकोज का कार्यशील मानक विलयन: एक साफ सूखी परखनली में 0.1 मिली से 1 मिली तक पिपेट से निकालें, 0.05 एम साइट्रेट बफर (पीएच 4.8) के साथ आयतन 1 मिली तक करें और 1 मिली 0.05एम साइट्रेट बफर (pH 4.8) लेकर ब्लेंक तैयार करें; और

(ड) नमूना विलयन की तैयारी: नमूना लेने से पहले उत्पाद को अच्छी तरह मिलाएं या हिलाएं, तरल उत्पाद के लिए, नमूने का 1 मिली लें और 0.05एम साइट्रेट बफर (pH 4.8) को मिलाकर तनु करें और संगणना के लिए तनुकरण कारक का उपयोग करें और पाउडर उत्पाद के लिए, 1 ग्राम नमूना लें और इसे 10 मिली 0.05एम साइट्रेट बफर (पीएच 4.8) में घोलें और परीक्षण के लिए इस नमूने का 1 मिली लें।

37.3 प्रक्रिया-

(क) परखनली में 1 मिलीलीटर परीक्षण नमूना, ब्लेंक और ग्लूकोज कार्यशील मानक लें और 50 °से. पर तैयार वॉटर बाथ में तीस मिनट के लिए इनक्यूबेट करें;

(ख) 3 मिलीलीटर डीएनएसए अभिकर्मक डालें और परखनली को उबलते वॉटर बाथ में पंद्रह मिनट के लिए इनक्यूबेट करें; और

(ग) नमूनों को ठंडा करें और स्पेक्ट्रोफोटोमीटर में 575 एनएम पर अवशोषण पढ़ें।

37.4 संगणना-

(क) ग्लूकोज का मानक कर्व तैयार करें तथा नमूनों में अपचायक शर्करा के प्रकलन के लिए अशाकन करें; और

(ख) समीकरण का उपयोग करके एंजाइम कर्यलाप को आईयू/एमएल के रूप में व्यक्त करें-

सीएमकेस कर्यलाप = ग्लूकोज रिलीज (मिलीग्राम) x 0.37 x डीएफ़ (यदि कोई हो तो)

37.5 संदर्भ-

घोष टीके 1987. सेल्यूलेज कर्यलाप का मापन. शुद्ध और अनुप्रयुक्त रसायन विज्ञान 59: 257-268.

38. *विकरहामो माइसेसानोमोलस* की गणना का अवधारण -

38.1 उपकरण-

(क) ऐनालिटिकल बैलेंस
(ख) पीएच मीटर
(ग) आटोक्लेव।
(घ) जैव सुरक्षा कैबिनेट या लेमिनार एयर फ्लो चेम्बर
(ङ) इनक्यूबेटर
(च) कॉलोनी काउंटर

38.2 ग्रोथ मीडियम और डाइल्यूऐंट की तैयारी -

(क) ग्रोथ मीडियम: निम्न तालिका में विनिर्दिष्ट संरचना के अनुसार रोज बंगाल अगर मीडिया तैयार करें

तालिका

क्र. सं.	संघटक	ग्राम प्रति लीटर
(i)	डेक्सट्रोज़	10
(ii)	पेप्टोन	5
(iii)	मोनोपोटेशियम फॉस्फेट	1
(iv)	मैग्नीशियम सल्फेट	0.5
(v)	रोज बंगाल	0.05
(vi)	अगर	18
(vii)	पीएच	7.2± 0.2

(ख) तैयार किए गए मीडिया को 121°से. पर 15 मिनट के लिए ऑटोक्लेव करें, 10 मिली फ़िल्टर से विसंक्रामित क्लोरोटेट्रासाइक्लिन या क्लोरैमफेनिकॉल (1% भार /आयतन) मिलाएं;

(ग) डाइलूएंट : फिजियोलॉजिकल सलाइन (0.9% सोडियम क्लोराइड) —0.9 ग्राम सोडियम क्लोराइड को 100 मिलीलीटर जल में मिलाएं।

38.3 प्रक्रिया-

(क) क्र. सं. 38.2 में वर्णित संघटन और प्रक्रिया के अनुसार रोज बंगाल अगर मीडिया तैयार करें और इसे 45–50 °से. तक ठंडा होने दें।

(ख) लैमिनार फ्लो बेंच पर प्रत्येक पेट्री प्लेट में लगभग 15–20 मिलीलीटर मीडिया डालें,

(ग) परीक्षण नमूने की 10 ग्राम मात्रा को 250 मिलीलीटर कोनिकल फ्लास्क में 90 मिलीलीटर ऑटोक्लेव किए गए फिजियोलॉजिकल सलाइन के साथ मिलाएं, इसे शेकर पर 150 आरपीएम पर 30 मिनट तक हिलाएं। इससे 10^{-1} विलयन प्राप्त होता है।

(घ) नौ ट्यूबें तैयार करें, जिसमें प्रत्येक में फिजियोलॉजिकल सलाइन हो, इन्हें ऑटोक्लेव करके ठंडा करें, 10^{-1} विलयन से 1 मिलीलीटर भाग निकालकर 9 मिलीलीटर फिजियोलॉजिकल सलाइन वाली अगली ट्यूब में डालें, इससे 10^{-2} विलयन बनता है। इसी प्रकार, प्रत्येक बार 1 मिलीलीटर को 9 मिलीलीटर में मिलाकर सीरियल विलयन 10^{-9} तक तैयार करें।

(ङ) प्रत्येक विलयन से 0.1 मिलीलीटर को रोज़ बंगाल अगर प्लेट पर स्प्रेड प्लेट करें, प्लेट्स को 28° से. पर इनक्यूबेटर में रखें, प्रत्येक डाइल्यूशन के लिए तीन प्लेट्स (त्रैतीयक) बनाए रखें,

(च) पांच दिन बाद प्लेट्स का निरीक्षण करें, मुलायम, ग्लैब्रोस (बाल रहित), यीस्ट जैसे, सफेद से क्रीम रंग के कॉलोनी की संख्या गिनें।

38.4 संगणना-

कॉलोनी बनाने वाली इकाई (सीएफ़यू प्रति ग्राम)	=	कॉलोनियों की संख्या (तीन पुनरावृत्तियों का औसत)	x	विलयन कारक	x	10

38.5 संदर्भ-

जार्विस बी 1973 खाद्य पदार्थों में फफूंदों और यीस्ट के चयनात्मक पृथक्करण और संगणना के लिए बेहतर रोज़ बंगाल-क्लोरटेट्रासाइक्लिन अगर की अन्य मीडिया के साथ तुलना, जर्नल ऑफ बैक्टीरियोलॉजी 36: 723- 727

39. यूजेनॉल का अवधारण.-

39.1 उपकरण-

(क) जीसी-एफआईडी।

(ख) वीए-5 एमएस केपिलरी कॉलम (30 मीटर x 0.25 मिमी x 0.25 माइक्रोमीटर) से सुसज्जित जीसी-एमएस,

(ग) ऐनालिटिकल बैलेंस

39.2 रसायन, गैस और अभिकर्मकों की तैयारी-

(क) यूजेनॉल (सी.ए.एस. नं 97-53-0)

(ख) हेक्सेन (सी.ए.एस. नं 110-54-3)

(ग) नाइट्रोजन गैस

(घ) एयर गैस

(ङ) हाइड्रोजन गैस

(च) मानक विलयन : 1.0 मिली शीशी में मानक यूजेनॉल (1.0 मि.ग्रा.) लें और 1.0 मिली हेक्सेन डालकर मिलाएं,

(छ) नमूना विलयन : 1.0 मिलीलीटर शीशी में नमूना (1.0 मिलीग्राम) लें और 1.0 मिलीलीटर हेक्सेन डालें और मिलाएं।

39.3 प्रक्रिया-

जीसी-एफआईडी स्थितियां : जीसी-एफआईडी स्थितियां निम्न तालिका में निर्दिष्ट हैं.-

तालिका

(i)	कॉलम	केपिलरी कॉलम, एसएच आरटीएक्स-5 (30 मीटर× 0.25 मिलीमीटर× 0.25 माइक्रो मीटर)
(ii)	वाहक गैस	नाइट्रोजन
(iii)	प्रवाह दर	1 मिली/मिनट (स्पिलट मोड, 1:20)
(iv)	इंजेक्शन आयतन	0.2माइक्रोलीटर
(v)	इंजेक्टर तापमान	250°से.
(vi)	डिटेक्टर तापमान	260°से.
(vii)	ओवन तापमान	60°से. से 250°से.
(viii)	रैम्प प्रोग्राम	60°से. और 3°से./मिनट से 250°से. पर स्पिलट मोड में प्रोग्राम करना (1:20)

39.4 गणना-

एफआईडी प्रतिक्रिया कारक के लिए बिना सुधार कंप्यूटर द्वारा गणना की गई जीसी पीक क्षेत्रों (कर्व के अधीन क्षेत्र अर्थात, एयूसी) के आधार पर यूजेनॉल की सापेक्ष मात्रा की गणना करें,

$$\text{कुल यूजेनाल\%} = \frac{\text{नमूना पीक का एयूसी} \times \text{मानक की सांद्रता (मिलीग्राम/लीटर)} \times \text{मानक की शुद्धता का \%}}{\text{नमूना पीक का कुल एयूसी} \times \text{नमूने की सांद्रता (मिलीग्राम/लीटर)}}$$

39.5 संदर्भ -

अजित, एम., पंकज, शकील, एन.ए., कौशिक, पी., और राणा, वी.एस. सुगन्धित तेलों और उनके प्रमुख यौगिकों की *मेलोइडोगाइन ग्रैमिनिकोला* (चावल की जड़-गाँठ सूत्रकृमि) के विरुद्ध रासायनिक संरचना और निमेटोसाइडल क्रियाशीलता। जर्नल ऑफ एसेंशियल ऑयल रिसर्च 2020, 32, 526-535

40. फोलिक एसिड (विटामिन बी9) का अवधारण -

40.1 उपकरण-

(क) बाइनरी ग्रेडिएंट पंप के साथ एचपीएलसी
(ख) ऐनालिटिकल बैलेंस
(ग) सेंट्रीफ्यूज
(घ) माइक्रोपिपेट (100 -1000 माइक्रोलीटर, 20 -200 माइक्रोलीटर 10 -100 माइक्रोलीटर)
(ङ) सोनिकेटर
(च) वोर्टेक्स मिक्सर
(छ) होमोजेनाइज़र
(ज) 0.45 माइक्रोमीटर नायलॉन सिरिंज फ़िल्टर

40.2 रसायन और अभिकर्मकों की तैयारी-

(क) अमोनियम हाइड्रॉक्साइड (सी.ए.एस. न. : 1336-21-6)।
(ख) फॉस्फोरिक एसिड (सी.ए.एस. न. : 7664-38-2)।
(ग) मोनोबेसिक पोटेशियम फॉस्फेट (सी.ए.एस. न. : 7778-77-0)।
(घ) टेट्राब्यूटाइल अमोनियम हाइड्रॉक्साइड (सी.ए.एस. न. : 2052-49-5)।
(ङ) मेथनॉल (सी.ए.एस. न. : 67-56-1)।
(च) फोलिक एसिड (सी.ए.एस. न. : 59-30-3)।
(छ) जल (एचपीएलसी ग्रेड/अति-शुद्ध जल)।
(ज) 0.5एम टेट्राब्यूटाइल अमोनियम हाइड्रॉक्साइड: 1000 मिलीलीटर मेथनॉल में 129.735 ग्राम टेट्राब्यूटाइल अमोनियम हाइड्रॉक्साइड घोलें।
(झ) 3एन फॉस्फोरिक एसिड: 1000 मिलीलीटर फ्लास्क में 67.8 मिलीलीटर 85% फॉस्फोरिक एसिड लें, मात्रा 1000 मिलीलीटर तक करने के लिए जल मिलाएँ।
(ञ) 6 एन अमोनियम हाइड्रॉक्साइड: 500 मिलीलीटर शुद्ध जल में 198 मिलीलीटर सांद्र अमोनियम हाइड्रॉक्साइड (28% अमोनियम हाइड्रॉक्साइड, विशिष्ट गुरुत्व 0.90) मिलाएँ और 1000 मिलीलीटर आयतन तक तनु करें,
(ट) मोबाइल फेज की तैयारी.-
(i) 1000 मिली वोल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 2.0 ग्राम मोनोबेसिक पोटेशियम फॉस्फेट का सही-सही वजन करें और उसमें 650 मिली जल मिलाएँ;

(ii) 15 मिली 0.5एम टेट्राब्यूटाइल अमोनियम हाइड्रॉक्साइड और 7.0 मिली 3एन-फॉस्फोरिक एसिड मिलाएँ;

(iii) 270 मिली मेथनॉल मिलाएँ और इसे कमरे के तापमान तक ठंडा करें;

(iv) 3N-फॉस्फोरिक एसिड या 6 एन अमोनियम हाइड्रॉक्साइड के साथ पीएच 5.0 समायोजित करें; और

(v) अंत में अति-शुद्ध जल से आयतन को 1000 मिली तक करें।

(ठ) नमूना विलयन की तैयारी.-

(i) 1 ग्राम (± 0.1 ग्राम) नमूने का सटीक वजन लें और उसमें 0.1 मिली 10% अमोनियम हाइड्रॉक्साइड मिलाएँ और फिर उसे 10 मिली एम्बर रंग के वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें, 5 मिली मोबाइल फेज़ मिलाएँ और पाँच मिनट तक वोर्टेक्स में रखें

(ii) नमूने के विलयन को कमरे के तापमान पर ठंडा करें;

(iii) दो मिनट तक वोर्टेक्स में रखें और मोबाइल फेज़ के साथ आयतन को 10 मिली तक बनाएँ;

(iv) विलयन को 0.45 माइक्रोमीटर नायलॉन सिरिंज फिल्टर से छान लें; और

(v) निस्स्यंद को शीशी में डालें और एचपीएलसी में इंजेक्शन लगाने के लिए इसका उपयोग करें।

टिप्पण : यदि आवश्यक हो, तो नमूने को वांछित सांद्रता तक तनु करें।

(ड) फोलिक एसिड के मानक स्टॉक विलयन की तैयारी.-

(i) 10 मिली एम्बर रंग के वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 10 मि.ग्रा. (± 0.1 मि.ग्रा.) फोलिक एसिड स्टैण्डर्ड का ठीक ढंग से वजन करें और उसमें 0.1 मि.ली. 10% अमोनियम हाइड्रॉक्साइड विलयन मिलाएँ और मोबाइल फेज से वॉल्यूम को 10 मि.ली. तक बनाएँ, दो मिनट तक वोर्टेक्स में घुमाएँ, विलयन को -20°से. पर प्रकाश प्रोटेक्टेड एरिया में संग्रहित करें, इससे 1000 मि.ग्रा./कि.ग्रा. का मानक स्टॉक विलयन (एसएसएस) प्राप्त होता है; और

(ii) नीचे दी गई तालिका में निर्दिष्ट विवरण के अनुसार कैलीब्रेशन मानक विलयन तैयार करें।

तालिका

क्र. सं.	***कैलीब्रेशन मानक विलयन***	***मानक* स्टॉक *विलयन* (मिलीग्राम/किग्रा)**	***स्टैण्डर्ड* स्टॉक *विलयन* का आयतन (मिली)**	**फाइनल मेकअप आयतन तानुकारक (मिली)**	**फाइनल कनसंन्ट्रेशन (मिलीग्राम/किग्रा)**
(i)	लीनियरटी विलयन 6	1000	1.50	10	150
(ii)	लीनियरटी विलयन 5	1000	1.20	10	120
(iii)	लीनियरटी विलयन 4	1000	1.00	10	100
(iv)	लीनियरटी विलयन 3	1000	0.85	10	85
(v)	लीनियरटी विलयन 2	1000	0.50	10	50
(vi)	लीनियरटी विलयन 1	1000	0.20	10	20
टिप्पण : कैलीब्रेशन मानक विलयन हमेशा नया तैयार करें।					

40.3 प्रक्रिया-

निम्न तालिका में निर्दिष्ट स्थितियों का पालन करते हुए एचपीएलसी विश्लेषण करें।

तालिका

(i)	उपकरण	एचपीएलसी
(ii)	डिटेक्टर	यूवी
(iii)	वेबलैंथ	280 एनएम
(iv)	कॉलम	सी-18 ओडीएस कॉलम (4.6 मिमी x 250 मिमी x 5 माइक्रोमीटर)
(v)	रन टाइम	10 मिनट
(vi)	फ्लो रेट	1.8 मिली/मिनट
(vii)	इंजेक्शन आयतन	10 µl
(viii)	कॉलम तापमान	25°से.
टिप्पण : उपकरण और कॉलम का मेक, मॉडल बदला जा सकता है, तथापि उपकरण वांछित जांच स्तर (एलओडी) और परिमाणीकरण स्तर (एलओक्यू) मान को प्राप्त करने में सक्षम होना चाहिए और कॉलम कंपोज़ीशन और डायमेंशन के संदर्भ में बिल्कुल समान होना चाहिए।		

40.4 गणना-

निम्नलिखित समीकरण का उपयोग करके प्रीमिक्स में फोलिक एसिड की गणना करें-

$$\text{फोलिक एसिड (विटामिन बी9) (मिलीग्राम / किलोग्राम)} = \frac{\text{नमूना सांद्रता (मिलीग्राम/किग्रा) x मेक अप आयतन (मिलीलीटर)}}{\text{नमूने का वजन (ग्राम)}}$$

40.5 संदर्भ-

मेथड प्रोटोकॉल: पीआटी/आर/पीआरएम /2023/001, एचपीएलसी का उपयोग करके प्रीमिक्स में फोलिक एसिड (विटामिन बी9) के आकलन हेतु मेथड वैलिडेशन रिपोर्ट। यूनाइटेड स्टेट्स फार्माकोपिया- फोलिक एसिड (जांच)।

41. होमोब्रासिनोलाइड का अवधारण -

41.1 उपकरण-

(क) रिवर्स फेज सी-18 कॉलम (150 मिमी × 4.6 मिमी x 3माइक्रोलीटर)
(ख) यूवी डिटेक्टर (ईएलएसडी)
(ग) वेइंग बैलेंस
(घ) अल्ट्रासोनिक बाथ
(ङ) थर्मोस्टेट
(च) 0.22माइक्रोन सिरिंज फ़िल्टर

41.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी-

(क) जल (अल्ट्रा-प्योर/एचपीएलसी ग्रेड)
(ख) एसीटोनिट्राइल (सी.ए.एस. न. 75-05-8)
(ग) मेथनॉल (सी.ए.एस. न. 67-56-1)
(घ) (22एस, 23एस)-28- होमोब्रासिनोलाइड (सी.ए.एस. न. 82373-95-3)
(ङ) फेनिलबोरोनिक एसिड

(च) मोबाइल फेज की तैयारी: एसीटोनिट्राइल (80 मिली) और जल (20 मिली) को (80:20, वी/वी) के अनुपात में मिलाएँ और पंद्रह मिनट तक सोनिकेट करें

(छ) फेनिलबोरोनिक एसिड विलयन की तैयारी: लगभग 1500 मिलीग्राम (निकटतम 0.01 ग्राम तक) फेनिलबोरोनिक एसिड को 250 मिली के वोल्यूमेट्रिक फ्लास्क में तौलें, मेथनॉल के साथ निशान तक घोलें और अच्छी तरह मिलाएँ।

(ज) 28-होमोब्रासिनोलाइड स्टॉक स्टैण्डर्ड विलयन तैयार करना:

(i) 25 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में 28-होमोब्रासिनोलाइड के 10 मिलीग्राम को सही ढंग से तौलें और इसे घोलने के लिए मेथनॉल (15 मिली) मिलाएँ;

(ii) फिर 4 मिली फेनिलबोरोनिक एसिड विलयन मिलाएँ और इसे 50°से. पर थर्मोस्टेट में तीस मिनट तक रखें;

(iii) विलयन को कमरे के तापमान तक ठंडा होने दें और मेथनॉल से निशान तक भरें;

(iv) अच्छी तरह मिलाएँ और फ्लास्क को पाँच मिनट के लिए अल्ट्रासोनिक बाथ में रखें, फिर विश्लेषण से पहले विलयन को 0.45 माइक्रोन फ़िल्टर से छान लें;

(v) इससे 400 मिलीग्राम/लीटर का स्टॉक मेम्ब्रेन विलयन प्राप्त होता है; और

तालिका

क्र. सं.	रैखिकता मानक	स्टॉक विलयन का सांद्रण (पीपीएम)	उपयोग किए जाने वाले स्टॉक घोल की आयतन (एमएल)	उपयोग किए जाने वाले मेथनॉल की आयतन (एमएल)	कॉन्सेन्ट्रेशन मानक का (मिलीग्राम/ लीटर)
(i)	मानक 1	400	0.20	0.80	80
(ii)	मानक 2	400	0.40	0.60	160
(iii)	मानक 3	400	0.60	0.40	240
(iv)	मानक 4	400	0.80	0.20	320
(v)	मानक 5	400	1.00	0.00	400

(ञ) नमूने की तैयारी.-

(i) नमूना लेने से पहले उत्पाद को अच्छी तरह मिलाएँ या हिलाएँ;

(ii) 25 मिली वोलुमीट्रिक फ्लास्क में 10 मिलीग्राम या 28- होमोब्रासिनोलाइड का 10 मिलीग्राम धारित नमूने की मात्रा लें;

(iii) घोलने के लिए 15 मिलीलीटर मेथनॉल मिलाएँ;

(iv) 4 मिली फेनिलबोरोनिक अम्ल विलयन मिलाएँ और इसे 50°से. पर थर्मोस्टेट में तीस मिनट तक रखें;

(v) विलयन को कमरे के तापमान तक ठंडा होने दें और मेथनॉल से निशान तक भरें; और

(vi) अच्छी तरह मिलाएँ और फ्लास्क को पाँच मिनट के लिए अल्ट्रासोनिक बाथ में रखें, फिर विश्लेषण से पहले विलयन को 0.45 माइक्रोन फ़िल्टर मैम्बरेन से छान लें।

41.3 प्रक्रिया.-

नीचे दी गई तालिका में निर्दिष्ट स्थितयों के अनुसार एचपीएलसी विश्लेषण करें।

तालिका

(i)	कॉलम	सी18 (150 मिमी x 4.6 मिमी x 5 माइक्रोन)
(ii)	डिटेक्टर	यूवी
(iii)	डिटेक्टिंग वेबलेन्थ	220 एनएम

(iv)	प्रवाह दर	1.0 मिली/ मिनट
(v)	कॉलम तापमान	25 ^{0} सेल्सियस
(vi)	मोबाइल फेज़	*एसीटोनिट्राइल: वाटर (80: 20)*
(vii)	रन टाइम	20 मिनट
(viii)	इंजेक्शन आयतन	10 माइक्रोलीटर

41.4 गणना.-

$$\text{एफ} = \frac{\text{28-होमोब्रासिनोलाइड मानक का द्रव्यमान (मिलीग्राम) x 28-होमोब्रासिनोलाइड मानक की शुद्धता (ग्राम/किग्रा)}}{\text{केलीब्रेशन विलयन में 28-होमोब्रासिनोलाइड पीक क्षेत्र}}$$

$$\text{28-होमोब्रासिनोलाइड का अंश (ग्राम/किग्रा)} = \frac{\text{नमूना विलयन में 28-होमोब्रासिनोलाइड की पीक क्षेत्र x एफ}}{\text{लिए गए नमूने का द्रव्यमान (मिलीग्राम)}}$$

41.5 संदर्भ.-

सीआईपीएसी/5247/एम 28-होमोब्रासिनोलाइड (जून 2020)।

42. प्रोटीन का अवधारण.-

(क) कुल नाइट्रोजन (नाइट्रेट मुक्त नमूनों में) अवधारण के लिए अनुसूची-II के भाग ख में क्रम संख्या 3 पर दिए गए विस्तृत प्रोटोकॉल का पालन करें; और

(ख) अवधारित कुल नाइट्रोजन से निम्न सूत्र का उपयोग कर प्रोटीन अवधारण करें.-

$$\text{प्रोटीन (\%)} = \text{कुल नाइट्रोजन} \times 6.25$$

43. एचपीएलसी द्वारा विटामिन-बी3 (नियासिन) का अवधारण.-

43.1. उपकरण.-

(क) फ्लूअरेसन्स डिटेक्टर के साथ एचपीएलसी प्रणाली।

(ख) कॉलम - लिक्रोस्फीयर® 60 आर पी-18 (250 मिमी x 4.0 मिमी x 5 माइक्रोन)

(ग) 0.22 माइक्रोन सिरिंज फ़िल्टर

43.2 रसायन और अभिकर्मक तैयार करना.-

(क) सोडियम एसीटेट,

(ख) पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट, (KH_2PO_4),

(ग) नॉन-स्टेबिलाइज्ड हाइड्रोजन पेरोक्साइड विलयन, H_2O_2 (30%),

(घ) कॉपर सल्फेट,

(ङ) एसीटिक अम्ल,

(च) सांद्र हाइड्रोक्लोरिक एसिड घोल,

(छ) सोडियम हाइड्रॉक्साइड,

(ज) निकोटिनिक एसिड (सीएएस न. 59-76-6),

(झ) निकोटिनामाइड (सीएएस न. 98-92-0),

(ञ) जल (एचपीएलसी ग्रेड),

(ट) 0.1एम हाइड्रोक्लोरिक एसिड घोल: एक सूखा और साफ किया हुआ 1000 मिली वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क लें और उसमें 100 मिली जल डालें, 8.3 मिली सांद्र हाइड्रोक्लोरिक एसिड डालें, जल के साथ निशान तक आयतन तैयार करें और घोल को अच्छी तरह से मिलाएं,

(ठ) कॉपर सल्फेट घोल, [Cu(II)SO4.5H2O], यह मोबाइल फेज तैयार करने हेतु तनुकरण के लिए उपयुक्त होना चाहिए।

(ड) पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट ($KH_2 PO_4$) विलयन , यह मोबाइल फेज तैयार करने हेतु तनुकरण के लिए उपयुक्त होना चाहिए।

(ढ) हाइड्रोजन पेरोक्साइड विलयन ($H_2 O_2$), यह मोबाइल फेज तैयार करने हेतु तनुकरण के लिए उपयुक्त होना चाहिए।

(ण) 5एम सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन: 20 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साइड को 80 मिलीलीटर जल में घोलें, ठंडा होने के बाद 100 मिलीलीटर तक पतला करें।

(त) निकोटिनिक एसिड स्टॉक विलयन (1 मिलीग्राम/मिलीलीटर) की तैयारी: निकोटिनिक एसिड मानक पदार्थ (100 मिलीग्राम) को जल (100 मिलीलीटर) में घोलें, यह विलयन -18±1°से. पर एक सप्ताह तक स्थिर रहता है।

(थ) निकोटिनिक एसिड (एनए) और निकोटिनामाइड (एनएएम) मानक विलयन (0.05 - 5 माइक्रो ग्राम /मिली): 100 मिलीलीटर जल में प्रत्येक स्टॉक विलयन के 1 मिलीलीटर के साथ पहला विलयन तैयार करें, और इस विलयन से 100 मिलीलीटर जल में चार मानक विलयन (0.5 मिलीलीटर, 2.5 मिलीलीटर, 10 मिलीलीटर और 50 मिलीलीटर) तैयार करें, ये विलयन कमरे के तापमान पर एक दिन के लिए स्थिर हैं।

(द) नमूना तैयार करना:

(i) नमूने (0.5- 2.0 ग्राम) को 25 मिलीलीटर 0.1एम हाइड्रोक्लोरिक एसिड के साथ वोर्टेक्स पर मिलाएं;

(ii) ट्यूबों को तैयार वाटरबाथ में एक घंटे तक गर्म करें;

(iii) एक्स्ट्रैक्ट को एर्लेनमेयर फ्लास्क (250 एमएल) में स्थानांतरित करें, और 20 मिलीलीटर डिस्टिल्ड जल और 4 मिलीलीटर 5एम सोडियम हाइड्रॉक्साइड मिलाएं, फ्लास्क को एक घंटे के लिए 121± 1 °से. पर आटोक्लेव करें;

(iv) ठंडा करने के पश्चात्, एक्स्ट्रैक्ट के पीएच को पहले सांद्रित और फिर तनु 0.1एम हाइड्रोक्लोरिक एसिड के साथ 4.5 तक स्थिर करें; और

(v) डिस्टिल्ड जल के साथ एक्स्ट्रैक्ट को 100 मिलीलीटर तक तनु करें और एचपीएलसी शीशियों में फ़िल्टर करें।

43.3 प्रक्रिया.-

(क) नियासिन विटामिनर्स (एनए और एनएएम) को नार्मल फेज सिलिका (एचएसएस) टी3 कॉलम (2.1 × 150 मिमी, 1.8 माइक्रोन) के साथ अलग करें।

(ख) पोटेशियम फॉस्फेट बफर (पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट के 70 मिलीएम; पीएच 4.5) में कॉपर सल्फेट ($CuSO_4$, 5 माइक्रो एम) और हाइड्रोजन पेरोक्साइड (H2O2, 150 मिलीएम) की अनुकूलित सांद्रता से युक्त मोबाइल फेज (0.3 मिलीलीटर/मिनट) के आइसोक्रेटिक प्रवाह का उपयोग करके 30 डिग्री सेल्सियस पर क्रोमैटोग्राफिक पृथक्करण करें,

(ग) कॉलम से निकलने वाले इल्यूएंट प्रवाह को एक निटेड पीटीईई प्रतिक्रिया कॉयल (1.59 मिमी ओडी, 0.17 मिमी आईडी और 5 मीटर लंबाई) में लंबी तरंगदैर्ध्य यूवी प्रकाश (366 एनएम, 8 डब्ल्यू) के संपर्क में लाएं,

(घ) एनए और एनएएम का फ्लोरोमेट्रिक रूप से (322 एनएम एक्साइटेशन और 380 एनएम उत्सर्जन तरंगदैर्ध्य) पता लगायें,

(ङ) नमूना इक्स्ट्रैक्ट (10 माइक्रोलीटर) को दो प्रतियों में इंजेक्ट करें।

(च) एचपीएलसी स्थितियों का पालन निम्न तालिका में निर्दिष्ट अनुसार करें–

तालिका

(i)	कॉलम	नॉर्मल फेज सिलिका (एचएसएस) टी3 स्तंभ (2.1 × 150 मिमी, 1.8 माइक्रोमीटर)।
(ii)	मोबाइल फेज़	मोबाइल फेज का आइसोक्रेटिक प्रवाह, जिसमें पोटेशियम फॉस्फेट बफर (70मिली एम पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट, पीएच 4.5) में कॉपर सल्फेट (5 माइक्रो एम $CuSO_4$) और हाइड्रोजन पेरोक्साइड (150 मिली एम H_2O_2) की अनुकूलित सांद्रता सम्मिलित है।
(iii)	नमूना इंजेक्शन	10 माइक्रोलीटर.
(iv)	रिटेंशन टाइम	3.6 मिनट (निकोटिनिक एसिड के लिए)। 10.6 मिनट (निकोटिनामाइड के लिए)। (ये कॉलम फेज और डिमेन्शन्ज़ के साथ-साथ मोबाइल फेज प्रवाह दर के आधार पर भिन्न हो सकते हैं)।
(v)	प्रवाह दर	0.3 मिली/मिनट।
(vi)	तापमान	30 डिग्री सेल्सियस।
(vii)	रन टाइम	15 मिनट।
टिप्पण : निकोटिनिक एसिड (एनए) और निकोटिनामाइड (एनएडी) के लिए पता लगाने का स्तर क्रमशः 0.02 एनजी और 0.01 एनजी है, निकोटिनिक एसिड और निकोटिनामाइड के लिए मात्रा का स्तर (पता लगाने के स्तर का 3 गुना) क्रमशः 0.06 एनजी और 0.03 एनजी है।		

43.4 गणना.-

निकोटिनिक एसिड और निकोटिनामाइड सांद्रण की गणना एक्सटर्नल कैलीब्रेशन कर्व (कैलीब्रेशन रेंज: 0.2 - 20 एनजी) का उपयोग करके की जानी चाहिए।

43.5 संदर्भ.-

खाद्य पदार्थों में नियासिन के निर्धारण की विधि, 2022 (एफएसएसएआई)।

44. कैराबिटोल (कैरागीनन ओलिगोसेकेराइड व्युत्पन्न) का अवधारण. -

44.1 उपकरण.-

(क) एचपीएलसी क्रॉमसिल एलई पीबी + (8%) कॉलम (7.8 मिमी x 300 मिमी x 7µ) या यूएसपी एल34- आरपीएम मोनोसैकेराइड पीबी (+) कॉलम
(ख) अपवर्तक सूचकांक डिटेक्टर
(ग) एनालिटिकल बैलेंस
(घ) अल्ट्रासोनिक बाथ
(ङ) 0.22 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर

44.2 रसायन और अभिकर्मक.-

(क) जल (एचपीएलसी ग्रेड)
(ख) कैराबिटोल मानक

(ग) कैराबिटॉल मानक विलयन की तैयारी: 10 मिलीलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में कैराबिटॉल (0.01 ग्राम) तौलें और अंतिम आयतन एचपीएलसी ग्रेड जल के साथ तैयार करें और अच्छी तरह मिलाएँ,

(घ) विलयन को पंद्रह मिनट तक अल्ट्रासोनिकेट करें और 0.22 माइक्रोन सिरिंज फिल्टर से छान लें।

44.3 प्रक्रिया.-

निम्न तालिका में विनिर्दिष्ट स्थितियों के अनुसार एचपीएलसी विश्लेषण करें,

तालिका

(i)	कॉलम	क्रोमसिल एलई पीबी+ (8%) कॉलम
(ii)	डिटेक्टर	आरआई
(iii)	डिटेक्टर तापमान	35±2 °से.
(iv)	प्रवाह दर	0.6 मिली/मिनट
(v)	कॉलम तापमान	80 ± 2^0 सेल्सियस
(vi)	मोबाइल फेज़	*जल(एचपीएलसी ग्रेड)*
(vii)	रन टाइम	20 मिनट
(viii)	इंजेक्शन की मात्रा	10 माइक्रोलीटर
(ix)	ट्राई- कैराबिटोल (पीक 1)	आरआरटी: 1.75
(x)	टेट्रा- कैराबिटोल (पीक 2)	आरआरटी: 2.10
(xi)	हेक्सा - कैरेबिटोल (पीक 3)	आरआरटी: 2.25
(xii)	डि- कैराबिटोल (पीक 4)	रिटेंशन टाइम: 7-8 मिनट के बीच

44.4 गणना.-

(क) नमूने के लिए कैराबिटॉल एरिया (nRlU*s) = सभी चार पीक क्षेत्र का योग (पीक वन क्षेत्र + पीक 2 क्षेत्र + पीक 3 क्षेत्र + पीक 4 क्षेत्र); और

(ख) मानक के लिए कैराबिटॉल क्षेत्र % = सभी चार पीक क्षेत्र का योग (पीक वन क्षेत्र + पीक 2 क्षेत्र + पीक 3 क्षेत्र + पीक 4 क्षेत्र)।

$$\text{कुल कैराबिटोल (\%)} = \frac{\text{नमूना पीक क्षेत्र का औसत x मानक भार (ग्राम) x डाइल्यूशन कारक x मानक पीक क्षेत्र का औसत}}{\text{मानक पीक एरिया का औसत x नमूना भार (ग्राम)}}$$

44.5 संदर्भ.-

एमपीटीडी/एचपीएलसी/2021/ई01 18 (सीएसआईआर - राष्ट्रीय अंतःविषय विज्ञान और प्रौद्योगिकी संस्थान, माइक्रोबियल प्रक्रियाएं और प्रौद्योगिकी प्रभाग)।

45. हार्पिन -αβ का अवधारण.-

45.1. उपकरण.-

(क) एचपीएलसी।

(ख) अल्ट्रासोनिक बाथ।

(ग) एनालिटिकल बैलेंस

(घ) लैब्रटोरी ग्लासवेयर।

(ङ) फ्रीजर (-18°से.)।

45.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी.-

(क) हार्पिन αβ (सीएएस सं. 917237-54-8) ज्ञात शुद्धता का मानक,
(ख) एसीटोनिट्राइल,
(ग) जल,
(घ) ट्रीफ्लुओरोअसेटिक एसिड,
(ङ) कैलीब्रेशन मानक स्टॉक विलयन: 10 मिलीग्राम हार्पिन αβ का वजन करें और 50 मिलीलीटर वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में डालें, मोबाइल फेज ए के साथ आयतन को 50 मिलीलीटर तक करें,
(च) मोबाइल फेज ए में लगभग 50-150 माइक्रोग्राम/एमएल हार्पिन αβ पर कैलीब्रेशन मानक स्टॉक विलयन से कैलीब्रेशन विलयन तैयार करें,
(छ) नमूना विलयन: लगभग 1.0 ग्राम सैम्पल को मोबाइल फेज-ए (लगभग 100 माइक्रोग्राम/एमएल हार्पिन αβ) के साथ 100 मिलीलीटर तक तनु करें।

45.3 क्रोमैटोग्राफिक परिस्थितियाँ.-

क. निम्न तालिका में विनिर्दिष्ट परिस्थितियों के अनुसार एचपीएलसी विश्लेषण करें।

तालिका

(i)	कॉलम	ज़ोरबैक्स 300एसबी-सी8, 4.6 मिमी x 50 मिमी, 300 Ă, 5m यूएसजेके001535. (एक ज़ोरबैक्स 300एसबी सी 8 5 pm, 4.6 मिमी x 12.5 मिमी गार्ड कॉटरेज कॉलम सहित)।
(ii)	डिटेक्शन वेबलेंथ	218 एनएम.
(iii)	मोबाइल फेज़	मोबाइल फेज -ए: 0.1% ट्राइफ्लोरोएसिटिक एसिड + 99.9% वाटर (वी/वी)। मोबाइल फेज -बी: 0.1% ट्राइफ्लोरोएसेटिक एसिड + 94.9% एसीटोनिट्राइल + 5% वाटर (वी/वी)।
(iv)	सैम्पल इंजेक्शन	(20 माइक्रोलीटर)
(v)	रिटेंशन टाइम	7.4 मिनट
(vi)	प्रवाह दर	1.5 मिली/मिनट
(vii)	ताप	50^0से.

ख. एचपीएलसी विश्लेषण के दौरान निम्न तालिका में विनिर्दिष्ट मोबाइल फेज ग्रेडिएन्ट का अनुपालन किया जाना चाहिए।

तालिका

क्र. सं.	समय (मिनट)	मोबाइल फेज -बी का %
(i)	0.0	44
(ii)	5.0	54
(iii)	8.0	66
(iv)	8.5	100
(v)	9.5	100
(vi)	9.75	44
(vii)	12	44

45.4 गणना.-

$$\text{हार्पिन } \alpha\beta \text{ (मिलीग्राम/किलोग्राम)} = \frac{\text{नमूना क्षेत्र x मानक सांद्रता x तनुकरण}}{\text{मानक क्षेत्र x नमूना वजन}}$$

46. लैक्टोज का अवधारण.-

46.1 उपकरण.-

(क) वाटर बाथ,

(ख) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर ।

46.2 रसायन और अभिकर्मक की तैयारी.-

(क) जिंक एसीटेट - फॉस्फोटंगस्टिक एसिड (जेडएपीटी): 25.0 ग्राम जिंक एसीटेट और 12.5 ग्राम फॉस्फोटंगस्टिक एसिड को जल में घोलें, 20 मिली ग्लेशियल एसिटिक एसिड मिलाएं और 100 मिली तक घोल बनाएं,

(ख) ग्लाइसिन-NaOH बफर: 2.4768 ग्राम ग्लाइसिन और 1.9359 ग्राम सोडियम क्लोराइड युक्त 150 मिलीलीटर ग्लाइसिन घोल को 850 मिलीलीटर 0.385 एन सोडियम हाइड्रोक्साइड के साथ मिलाएं जिससे पीएच 12.8 हो जाए,

(ग) मिथाइलऐमीन विलयन : डिस्टिल वाटर में 5.0 ग्राम मिथाइलऐमीन हाइड्रोक्लोराइड घोलें और 100 मिलीलीटर तक तनु करें तथा रेफ्रिजरेटर में रखें,

(घ) सोडियम सल्फाइट विलयन 1% (डब्लू /वी): आसुत जल में 1.0 ग्राम सोडियम सल्फाइट घोलें और 100 मिलीलीटर तक तनु करें, ताजा तैयार करें,

(ङ) 1एन सोडियम हाइड्रोक्साइड विलयन: आसुत जल में 40 ग्राम सोडियम हाइड्रोक्साइड घोलें और आयतन एक लीटर करें,

(च) मानक लैक्टोज़ विलयन:

(i) स्टॉक विलयन: 2.5315 ग्राम लैक्टोज़ मोनोहाइड्रेट (यूएसपी ग्रेड) को 200 मिलीलीटर 0.1 प्रतिशत (डब्लू /वी) बेंजोइक एसिड में घोलें और रेफ्रिजरेटर में रखें; और

(ii) कार्यशील विलयन: 10, 15, 20, 25 और 30 मिलीलीटर स्टॉक विलयन को अलग-अलग 250 मिलीलीटर में तनु करें ताकि प्रति मिलीलीटर 0.5 से 1.5 मिलीग्राम लैक्टोज़ प्राप्त हो।

(छ) नमूने की तैयारी :

(i) 8.0 ग्राम अच्छी तरह मिश्रित नमूने में 1 मिली जेडएपीटी अभिकर्मक मिलाएं, 10 मिली तक तनु करें, और दस मिनट के बाद वॉटमैन नंबर 1 फिल्टर पेपर का उपयोग करके छान लें; और

(ii) 0.5 मिली निस्यंद में 0.5 मिली सोडियम हाइड्रोक्साइड विलयन मिलाएं, 10 मिली तक तनु करें और वॉटमैन नंबर 1 फिल्टर पेपर का उपयोग करके छान लें, 5 मिली निस्यंद को 10 मिली तक तनु करें।

46.3 प्रक्रिया.-

(क) मानक वक्र की तैयारी और नमूने में माप : कार्यशील मानक लैक्टोज और अज्ञात विलयन के 5 मिलीलीटर पिपेट को 25 मिलीलीटर टेस्ट ट्यूब में डालें;

(ख) प्रत्येक ट्यूब में 5 मिलीलीटर ग्लाइसीन सोडियम हाइड्रोक्साइड बफर, 0.5 मिलीलीटर मिथाइलमाइन घोल और 0.5 मिलीलीटर सोडियम सल्फाइट घोल डालें, अच्छी तरह मिलाएं;

(ग) ट्यूबों को थर्मोस्टेटिक रूप से नियंत्रित वाटर बाथ में 65 डिग्री सेल्सियस पर पच्चीस मिनट तक गर्म करें और प्रतिक्रिया को रोकने के लिए तुरंत दो मिनट के लिए बर्फ के वाटर बाथ में ठंडा करें;

(घ) स्पेक्ट्रोफोटोमीटर या उपयुक्त स्पेक्ट्रोफोटोमीटर में 540 एनएम पर रिक्त स्थान के विरुद्ध अवशोषण को पढ़ें; और

(ङ) लैक्टोज की सांद्रता के विरुद्ध अवशोषण को आलेखित करके एक मानक वक्र बनाएं और इससे लैक्टोज की सांद्रता निर्धारित करें।

46.4 संदर्भ .-

निकर्सन एट आल. 1976. लैक्टोज़ और उसके हाइड्रोलाइटिक उत्पादों का कलेरमेट्रिक आकलन। जर्नल डेयरी साइंस 59, न. 3, पृष्ठ 386।"

[फा.सं. 3-5/2025-बायोस्टिमुलेंट्स]

फ्रैंकलिन एल खोबुंग, संयुक्त सचिव

टिप्पण : मूल आदेश भारत के राजपत्र में जीएसआर न. 758(अ) तारीख 25 सितंबर, 1985 द्वारा प्रकाशित किया गया था और अंतिम संसोधन का. आ. 4441 (अ) तारीख 29 सितम्बर, 2025 द्वारा किया गया था।

MINISTRY OF AGRICULTURE AND FARMERS WELFARE

(Department of Agriculture and Farmers Welfare)

ORDER

New Delhi, the 30th September, 2025

S.O. 4533(E). – In exercise of the powers conferred by section 3 of the Essential Commodities Act, 1955 (10 of 1955), the Central Government hereby makes the following Order further to amend the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Order, 1985, namely.-

1. (1) This Order may be called the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Eleventh Amendment Order, 2025.

(2) It shall come into force on the date of its publication in the Official Gazette.

2. In the Fertiliser (Inorganic, Organic or Mixed) (Control) Order, 1985, in Schedule VI, in Part D " METHODOLOGY OF TESTING" , after sub-heading 32, "Estimation of arsenic", the following items and the entries shall be inserted, namely.-

"33. Estimation of salicylic acid by HPLC.-

33.1 Equipment.-

(a) reverse phase C-18 column (250 mm×4.6 mm x 5µ).
(b) UV detector.
(c) analytical balance.
(d) 0.22µ syringe filter.

33.2 Chemicals and Reagent Preparations.-

(a) acetonitrile (HPLC grade, CAS No. 75-05-8).
(b) orthophosphoric acid (CAS No. 7664-38-2).

(c) salicylic acid (CAS No. 69-72-7).
(d) water (HPLC grade).
(e) preparation of mobile phase: take acetonitrile and water (with 0.1% orthophosphoric acid) in the ratio of 50: 50 v/v, sonicate it for 5 minutes and vacuum filter the solution and degas before use.
(f) preparation of stock solution of salicylic acid standard: take salicylic acid (10 mg) in 10 ml volumetric flask, add 7 ml of mobile phase to the flask, sonicate for 10 minutes, make up the volume to 10 ml with mobile phase, it gives a stock solution of 1000 ppm.
(g) preparation of working solution of salicylic acid: dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with mobile phase and mix well, it gives working standard solution of 100 ppm, dilute 1.0 ml of working standard solution to 10 ml with mobile phase, it gives working standard solution of 10 ppm, prepare calibration curve as specified in table below.-

Table

S. No.	Linearity standard.	Concentration of stock solution (ppm).	Volume (ml) of stock solution to be used.	Volume (ml) of water to be used.	Concentration of standard (µg/ml).
(i)	standard 1	10 ppm	0.10	0.90	1
(ii)	standard 2	10 ppm	0.50	0.50	5
(iii)	standard 3	10 ppm	1.0	0.00	10
(iv)	standard 4	100 ppm	0.25	0.75	25
(v)	standard 5	100 ppm	0.50	0.50	50
(vi)	standard 6	100 ppm	1.0	0.00	100

(h) preparation of sample solution.-
(i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;
(ii) for liquid products, accurately weigh 0.5 to 5 gram (±10%) of product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
(iii) for powdered products that do not require reconstitution, accurately weigh 1.0 gram powder into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
(iv) add approximately 10 to 15 ml mobile phase to 50 ml volumetric flask and swirl or stir to completely dissolve the powder, for powdered products that are not homogeneous at the sub gram level, reconstitute following the product label instructions and accurately weigh 1.0 gram reconstituted product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
(v) make up the volume to 50 ml with mobile phase;
(vi) sonicate it for thirty minutes and filter it through 0.22µ syringe filter; and
(vii) inject 10µl to HPLC- UV system for analysis.

33.3 Procedure.-

` perform analysis following HPLC conditions as specified in table below.-

Table

(i)	Column	C-18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µ)
(ii)	Detector	UV
(iii)	Detecting wavelength	237 nm
(iv)	Flow rate	1.0 ml/ minute
(v)	Column temperature	40°C
(vi)	Mobile phase	Isocratic elution with mobile phase using acetonitrile: water (50: 50 v/v) with 0.1% orthophosphoric acid
(vii)	Run time	50 minutes
(viii)	Injection volume	10 µl

33.4 Calculation.-

$$\text{Salicylic acid (mg/kg)} = \frac{\text{Sample area x Standard concentration x dilution}}{\text{Standard area x Sample weight}}$$

33.5 Reference.-

Kowalska M, Woźniak M, Kijek M, Mitrosz P, Szakiel J, Turek P. Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. Scientific Reports 2022 Jan 6;12 (1):1.

34. Estimation of cytokinin by HPLC.-

34.1 Equipment.-

(a) reverse phase C-18 column (250 mm×4.6 mm x 5 µm).
(b) UV detector.
(c) analytical balance.
(d) 0.22µ syringe filter.

34.2 Chemicals and Reagents Preparation.-

(a) acetonitrile (HPLC grade, CAS No. 75-05-8).
(b) water (HPLC grade).
(c) methanol (HPLC grade, CAS No 67- 56-1).
(d) preparation of mobile phase.-
solvent A - methanol: water: glacial acetic acid (50:450: l, v/v/v); and
solvent B - methanol: glacial acetic acid (500: 1, v/v)
(e) preparation of stock solution of zeatin standard stock standard solution: take 10 mg zeatin in 10 ml volumetric flask. Add 1 ml of 0.1N NaOH and dissolve by sonication, make up the volume to 10 ml using methanol, it gives a stock solution of 1000 ppm.
(f) preparation of working solution of zeatin: dilute 1.0 ml stock standard to 10 ml with methanol and mix well, it gives an intermediate standard solution of 100 ppm, dilute 1.0 ml of intermediate standard solution to 10 ml with mobile phase, it gives an intermediate standard solution of 10 ppm, prepare calibration curve following details specified in table below.-

Table

S. No.	Linearity Standard	Conc. of Stock solution (ppm)	Volume (ml) of stock solution to be used	Volume (ml) of methanol to be used	Concentration of standard (µg/ml)
(i)	standard 1	10 ppm	0.50	0.50	5
(ii)	standard 2	10 ppm	1.0	0.00	10
(iii)	standard 3	100 ppm	0.5	0.50	50
(iv)	Standard 4	100 ppm	1.0	0.00	100
(v)	standard 5	1000 ppm	0.2	0.80	200
(vi)	standard 6	100 ppm	0.4	0.60	400

(g) preparation of sample solution.-
(i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;
(ii) for liquid products, accurately weigh 0.5 to 5 gram (±10%) of product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
(iii) for powdered products that do not require reconstitution, accurately weigh 1.0 gram powder into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
(iv) add approximately 10 to 15 ml mobile phase to 50 ml volumetric flask and swirl or stir to completely dissolve the powder, for powdered products that are not homogeneous at the sub gram level, reconstitute following the product label instructions and accurately weigh 1.0 gram reconstituted product into a 50 ml volumetric flask and record the weight to the nearest 0.0001 gram;
(v) sonicate it for thirty minutes and filter it through 0.22µ syringe filter; and
(vi) inject 10µl to HPLC-UV detector for analysis.

34.3 Procedure.-

(a) Initially condition the column with a solvent mixture of 80% of Solvent A and 20% of Solvent B, elute the compounds using solvent system given in HPLC conditions with a gradient elution of

increasing methanol concentration as zero to twenty minutes (20 % B+ 80 % A) to (45 % B+ 55 % A), twenty to twenty-two minutes (45 % B +55 % A), twenty-two to thirty minute (45 % B + 55 % A) to (60 % B + 40 % A), thirty to forty minute (60 % B to 40 % A); and

(b) HPLC conditions: perform HPLC analysis following HPLC operation conditions as specified in table below:

Table

(i)	column	C18 (250 mm x 4.6mm x 5 µ)
(ii)	detector	UV
(iii)	detecting wavelength	269 nm
(iv)	flow rate	0.5 ml/ minute
(v)	column temperature	30ºC
(vi)	mobile phase	solvent A- Methanol: water: glacial acetic acid (50:450: l, v/v/v) solvent B- Methanol: glacial acetic acid (500: 1, v/v)
(vii)	run time	40 minutes
(viii)	injection volume	20µl

34.4 Calculation.-

$$\text{Cytokinin (mg/kg)} = \frac{\text{sample area x standard concentration x dilution}}{\text{standard area x sample weight}}$$

34.5 Reference.-

Qi, B.;Wu, C.; Liang, H.; Cui, K.; Fahad, S.; Wang, M.; Liu, B.; Nie, L.; Huang, J.; Tang, H. Optimized High-Performance Liquid Chromatography Method for Determining Nine Cytokinins, Indole-3-acetic Acid and Abscisic Acid. Sustainability **2021**, 13, 6998.

35. Estimation of carbohydrate or saccharides.-

35.1 Equipment.-

(a) spectrophotometer.
(b) vortex mixer.
(c) heating mantle/water bath.
(d) weighing balance.

35.2 Chemicals and Reagents Preparation.-

(a) anthrone (CAS No. 90-44-8).
(b) concentrated HCl (CAS No. 7647-01-0).
(c) concentrated H_2SO_4(CAS No. 7664-93-9).
(d) 2.5N HCl: take 208.3 ml of concentrated HCl and make up the volume to 1000 ml with water.
(e) anthrone reagent: dissolve 200mg anthrone in 100ml of ice cold concentrated H_2SO_4, prepare fresh before use.
(f) stock standard glucose*:* dissolve 100mg glucose in 100ml water, it gives a stock of 1000 mg/ml glucose solution.
(g) working standard: dilute 10ml of stock solution to 100ml with distilled water, it gives a working standard of 100 mg/ml, store refrigerated after adding a few drops of toluene.

Note: *cool the contents of all the tubes on ice before adding ice-cold anthrone reagent.*

35.3 Procedure.-

(a) weigh 100mg of the sample into a boiling tube;
(b) hydrolyze by keeping it in boiling water bath for 3 hours with 5ml of 2.5N HCl and cool to room temperature;
(c) neutralize it with solid sodium carbonate until the effervescence ceases;

(d) make up the volume to 100ml and centrifuge;
(e) collect the supernatant and take 0.5ml and 1ml aliquots for analysis;
(f) prepare the standards by taking 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1ml of the working standard, '0' serves as blank;
(g) make up the volume to 1ml in all the tubes including the sample tubes by adding distilled water;
(h) add 4ml of ice cold anthrone reagent;
(i) heat for eight minutes in a boiling water bath;
(j) cool rapidly on ice and read the green to dark green color at 630nm;
(k) draw a standard graph by plotting concentration of the standard on the *X*-axis versus absorbance on the *Y*-axis; and
(l) from the graph calculate the amount of carbohydrate present in the sample tube.

35.4 Calculation.-

Amount of carbohydrate (in 100mg sample)	= (mg of glucose ÷ volume of test sample) x 100

35.5 Reference.-

Hedge, JE and Hofreiter BT (1962) In: Carbohydrate Chemistry **17** (Eds Whistler R L and Be Miller, J N) Academic Press New York.

36. Estimation of starch.-

36.1 Equipment.-

(a) water bath.
(b) high speed centrifuge.
(c) Spectrophotometer.
(d) analytical balance.

36.2 Chemicals and Reagents preparation.-

(a) ethanol 95%- to 95 ml of absolute ethanol add 5 ml of water.
(b) concentrated Perchloric acid.
(c) concentrated H_2SO_4.

36.3 Procedure.-

(a) homogenize 0.1 to 0.5gram of the sample in hot 80% ethanol to remove sugars, centrifuge and retain the residue, wash the residue repeatedly with hot 80% ethanol till the washing do not give color with anthrone reagent, dry the residue well over a water bath;
(b) to the residue add 5.0ml of water and 6.5ml of 52% perchloric acid;
(c) extract at 0°C for 20minutes, centrifuge and save the supernatant;
(d) repeat the extraction using fresh perchloric acid, centrifuge and pool the supernatant and make up to 100ml;
(e) pipette out 0.1ml or 0.2ml of the supernatant and make up the volume to 1 ml with water; and
(f) proceed for analysis of reducing sugars using anthrone reagent as detailed in protocol for estimation of carbohydrate or saccharides by anthrone method at Serial No. 35.

36.4 Calculation.-

Find out the glucose content in the sample using the standard graph, multiply the value by a factor 0.9 to arrive at the starch content.

36.5 Reference.-

Hodge JE and Hofreiter BT 1962. In: Methods in Carbohydrate Chemistry (eds Whistler RL and Be Miller JN) Academic Press New York.

37. Estimation of cellulase activity.-

37.1 Equipment.-

(a) spectrophotometer.
(b) water-bath.
(c) analytical balance.

37.2 Chemicals and Reagents preparation.-

(a) carboxy methyl cellulose (CAS No. 9004-32-4).
(b) dinitrosalicyclic acid (CAS No. 609-99-4).
(c) phenol (CAS No. 108-95-2).
(d) sodium sulfite (CAS No. 7757-83-7).
(e) rochelle salt (Potassium sodium tartarate)(CAS No. 6381-59-5).
(f) citric acid monohydrate (CAS No. 5949-29-1).
(g) citrate buffer: dissolve citric acid monohydrate (210gram) in 750 ml distilled water, adjust the pH to 4.3 using NaOH, make up the volume to 1000 ml and add NaOH to adjust the pH to 4.5 and this gives 1M Citrate buffer (pH 4.5), now take 5 ml of 1 M Citrate buffer, add 90 ml of distilled water and adjust the pH to 4.8 using NaOH and make up the volume to 100 ml with distilled water, this gives a solution of 0.05M Citrate buffer (pH 4.8).
(h) dinitrosalicylic acid (DNSA) stock solution: it comprises of solution A and solution B as given below.-
    (i) solution A: dissolve 10 gram of NaOH in 1000 ml of water, mix well to dissolve and it will give 1% NaOH solution; and
    (ii) solution B: to solution A, add 200 mg of K-Na tartarate, 2 gram of crystalline phenol and 10gram of DNS, place the beaker on a heater/stirrer and warm gently, whilst stirring, to dissolve, cool to ambient temperature and store the solution in amber coloured bottles at 4ºC.
(i) DNSA working solution: to 99 ml of stock DNSA, add 1 ml of 5% sodium sulfite and mix well to dissolve;
(j) substrate preparation: weigh 2gram of carboxymethyl cellulose (CMC) and dissolve it in 100 ml of 0.05M citrate buffer (pH 4.8), stir the mixture vigorously to promote dissolution and if necessary, heat the solution to a moderate temperature (e.g., 60°C) to facilitate dissolution;
(k) standard stock solution of glucose: dissolve 100mg glucose in 100ml water and it gives a stock of 1mg/ml;
(l) working standard solution of glucose: pipette out aliquots from 0.1 ml to 1 ml in a clean dry test tube, make up the volume to 1 ml with 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) and prepare blank by taking 1 ml 0.05 M citrate buffer (pH 4.8);and
(m) preparation of sample solution: thoroughly mix or stir products prior to sampling, for liquid products, take 1 ml of the sample and dilute with 0.05M citrate buffer (pH 4.8) and use the dilution factor for calculation, and for powdered products, take 1 gram of sample and dissolve it in 10ml of 0.05M citrate buffer (pH 4.8) and take 1 ml of the sample for testing.

37.3 Procedure.-

(a) take 1 ml of the test sample, blank and glucose working standards in the test tubes and incubate for thirty minutes in water bath maintained at 50ºC;
(b) add 3 ml of DNSA reagent and incubate the test tubes for fifteen minutes in a boiling water bath; and
(c) cool the samples and read the absorbance at 575 nm in spectrophotometer.

37.4 Calculation.-

(a) prepare a standard curve of glucose and calibrate for estimation of reducing sugars in the sample; and
(b) express the enzyme activity as IU/ml using the equation.-

CMCase activity= mg glucose released x 0.37 x DF (if any)

37.5 Reference.-

Ghose TK 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry 59: 257-268.

38. Enumeration of *Wickerhamo mycesanomolus.*-

38.1 Equipments.-

(a) analytical balance.
(b) pH meter.
(c) autoclave.
(d) biosafety cabinet or laminar air flow chamber.
(e) incubators.
(f) colony counter.

38.2 Preparation of growth medium and diluents.-

(a) growth medium: prepare Rose Bengal agar medium as per the composition specified in table below.-

Table

S. No.	Constituents	gram per liter
(i)	dextrose	10
(ii)	peptone	5
(iii)	mono potassium phospahte	1
(iv)	magnesium sulphate	0.5
(v)	rose Bengal	0.05
(vi)	agar	18
(vii)	pH	7.2± 0.2

(b) autoclave prepared media at 121°C for fifteen minutes and after autoclaving add 10 ml of filter sterilized chlorotetracycline or chloramphenicol (1% w/v).

(c) Diluent: Physiological saline (0.9% sodium chloride) - Add 0.9 gram of NaCl to 100 ml of water.

38.3 Procedure.-

(a) prepare the Rose Bengal medium in accordance with the composition and procedure described in Sl No. 38.2 above and let the medium cool to 45-50°C;

(b) pour about 15- 20 ml of medium into petri plates in a laminar flow bench;

(c) dispense 10gram of test sample to 90 ml of autoclaved physiological saline in 250 ml conical flask and shake for thirty minutes on shaker at 150 rpm and this gives 10^{-1}dilution of the sample;

(d) prepare nine tubes each containing physiological saline and autoclave and cool it;

(e) transfer 1 ml of aliquot from 10^{-1} dilution to a tube with 9 ml of physiological saline, this gives 10^{-2}diltuion and likewise, make serial dilutions up to 10^{-9} each time transferring 1 ml to 9 ml of physiological saline;

(f) spread plate 0.1 ml of serially diluted sample on rose Bengal agar plate and incubate the plates in an incubator maintained at 28°C and for each dilution, maintain plates in triplicate; and

(g) observe the plates for growth after five days, count the number of colonies that are smooth, glabrous (without hairs), yeast like, white to cream coloured.

38.4 Calculation.-

Colony forming unit (CFU per gram)	=	number of colonies (mean of three replicates)	x	dilution factor	x	10

38.5 Reference.-

Jarvis B 1973. Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods, Journal of Bacteriology 36: 723- 727

39. Estimation of Eugenol.-

39.1 Equipment.-

(a) GC-FID.

(b) GC-MS equipped with a VA-5 MS capillary columns (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm).

(c) weighing balance.

39.2 Chemicals, Gas and Reagents preparation.-

(a) eugenol (CAS No. 97-53-0).
(b) hexane (CAS No. 110-54-3).
(c) nitrogen gas.
(d) air gas.
(e) hydrogen gas.
(f) standard solution: take standard eugenol (1.0mg) in 1.0 ml vial and add 1.0ml hexane and mix.
(g) sample solution: take sample (1.0mg) in 1.0 ml vial and add 1.0ml hexane and mix.

39.3 Procedure.-

GC-FID Conditions: GC-FID conditions are specified in table below.-

Table

(i)	Column	Capillary column, SH Rtx-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)
(ii)	Carrier gas	Nitrogen
(iii)	Flow-rate	1 ml/minute (split mode, 1:20)
(iv)	Injection volume	0.2µl
(v)	Injector temperature	250°C
(vi)	Detector temperature	260°C
(vii)	Oven temperature	60°C to 250°C
(viii)	Ramp programe	60°C and programmed at 3°C/minute to 250°C with split mode (1:20)

39.4 Calculation.-

Calculate the relative amount of eugenol based on computer calculated GC peak areas (Area under Curve i.e., AUC) without corrections for FID response factor.

$$\text{Total Eugenol \%} = \frac{\text{AUC of the sample peak x concentration of standard (mg/L) x \% purity of standard}}{\text{Total AUC of standard peak x concentration of sample (mg/L)}}$$

39.5 Reference.-

Ajith, M., Pankaj, Shakil, N.A., Kaushik, P., and Rana, V.S. Chemical composition and nematicidal activity of essential oils and their major compounds against *Meloidogyne graminicola* (Rice Root-Knot Nematode). Journal of Essential Oil Research 2020, 32, 526-535.

40. Determination of Folic acid (Vitamin B9).-

40.1 Equipment.-

(a) HPLC with binary gradient pump.
(b) analytical balance.
(c) centrifuge.
(d) micropipettes (100 -1000 µl, 20 -200 µl 10 -100 µl).
(e) sonicator.
(f) vortex mixer.
(g) homogenizer.
(h) 0.45µm nylon syringe filter.

40.2 Chemicals and Reagents Preparation.-

(a) ammonium hydroxide (CAS No: 1336-21-6).
(b) phosphoric acid (CAS No: 7664-38-2).
(c) monobasic potassium phosphate (CAS No: 7778-77-0).
(d) tetrabutylammonium hydroxide (CAS No: 2052-49-5).
(e) methanol (CAS No 67- 56-1).
(f) folic Acid (CAS No: 59-30-3).
(g) water (HPLC grade/ultra-pure water).

(h) 0.5M tetra butyl ammonium hydroxide: dissolve 129.735 gram of tetra butyl ammonium hydroxide in 1000 ml methanol.

(i) 3N phosphoric acid: take 67.8 ml of 85% phosphoric acid in a 1000 ml flask, add water to make up the volume to 1000 ml.

(j) 6N ammonium hydroxide: add 198 ml of concentrated ammonium hydroxide (28% NH_4OH, specific gravity 0.90) to 500 ml of purified water and dilute to 1000 ml volume.

(k) Preparation of mobile phase.-

(i) accurately weigh 2.0 gram of monobasic potassium phosphate into a 1000 ml volumetric flask and add 650 mL of water to it;

(ii) add 15 ml of 0.5M tetra butyl ammonium hydroxide and 7.0 ml of 3-N-phosphoric acid;

(iii) add 270 ml of methanol and cool it to room temperature;

(iv) adjust pH 5.0 with 3 N-phosphoric acid or 6-N-ammonium hydroxide; and

(v) finally make the volume to 1000 ml with ultra-pure water.

(l) Preparation of sample solution.-

(i) accurately weigh 1 gram (± 0.1 gram) and add 0.1 ml of 10 % ammonium hydroxide and then transfer into a 10 ml amber colored volumetric flask, add 5 ml mobile phase and vortex for five minutes;

(ii) cool the sample solution at room temperature;

(iii) make up the volume to 10 ml with mobile phase and vortex for two minutes;

(iv) filter the solution through 0.45µm nylon syringe filter; and

(v) pour the filtrate into the vial, and use it for injecting into HPLC.

Note: *If required, dilute the sample for desired concentration.*

(m) Preparation of standard stock solution of folic acid.-

(i) accurately weigh 10 mg (± 0.1 mg) of folic acid standard in 10 ml amber coloured volumetric flask and add 0.1 ml of 10% ammonium hydroxide solution and make up the volume to 10 ml with mobile phase, vortex for two minutes, store the solution at -20°C in the light protected area, it gives a standard stock solution (SSS) of 1000 mg/kg; and

(ii) prepare calibration standard solutions as per the details specified in the table below.-

Table

S. No.	**calibration standard solutions**	**Standard Stock Solution (mg/kg)**	**volume of Standard Stock Solution (ml)**	**final make up volume diluent (ml)**	**final concentration (mg/kg)**
(i)	Linearity Solution 6	1000	1.50	10	150
(ii)	Linearity Solution 5	1000	1.20	10	120
(iii)	Linearity Solution 4	1000	1.00	10	100
(iv)	Linearity Solution 3	1000	0.85	10	85
(v)	Linearity Solution 2	1000	0.50	10	50
(vi)	Linearity Solution 1	1000	0.20	10	20
Note: *Always make fresh preparation of calibration standard solutions.*					

40.3 Procedure.-

Perform HPLC analysis following HPLC Conditions as specified in table below.-

Table

(i)	Instrument	HPLC
(ii)	Detector	UV
(iii)	Wavelength	280 nm

(iv)	Column	C-18 ODS Column (4.6 mm X 250 mm X 5 µm)
(v)	Run time	10 minutes
(vi)	Flow rate	1.8 ml/minute
(vii)	Injection Volume	10 µl
(viii)	Column Temperature	25°C
Note: *The make, model of Instrument & Column can be changed, however instrument should be able to achieve the desired Level of Detection (LOD) and Level of Quantification(LOQ) Value & the Column is exactly same in terms of the composition and dimensions.*		

40.4 Calculations.-

Calculate the folic acid content in premix using the following equation.-

$$\text{Folic Acid (Vitamin B9) (mg/kg)} = \frac{\text{Sample concentration (mg/kg) x make up volume (ml)}}{\text{Sample weight (gram)}}$$

40.5 Reference.-

Method protocol: PRT/RA/PRM/2023/001, method validation report for estimation of folic acid (Vitamin B9) in premix using HPLC. United States Pharmacopeia- Folic acid (assay).

41. Estimation of homobrassinolide.-

41.1 Equipment.-

(a) reverse phase C -18 column (150 mm×4.6 mm x 3µm).
(b) UV detector (ELSD).
(c) weighing balance.
(d) ultrasonic bath.
(e) thermostat.
(f) 0.22µ syringe filter.

41.2 Chemicals and Reagents preparation.-

(a) water (Ultra-pure/HPLC grade).
(b) acetonitrile (CAS No. 75-05-8).
(c) methanol (CAS No 67- 56-1).
(d) (22S, 23S)- 28- homobrassinolide (CAS No 82373-95-3).
(e) phenylboronic acid.
(f) preparation of mobile phase: mix Acetonitrile (80ml) and water (20ml) in a ratio of (80:20, v/v) and sonicate for fifteen minutes.
(g) preparation of phenylboronic acid solution: weigh approximately 1500mg (to the nearest 0.01gram) phenylboronic acid into 250ml volumetric flask, dissolve to the mark with methanol and mix thoroughly.
(h) preparation of 28-Homobrassinolide stock standard solution:
  (i) weigh accurately 10 mg of 28 Homobrassinolide in 25 ml volumetric flask and add methanol (15 ml) to dissolve it;
  (ii) add 4ml phenylboronic acid solution and keep it for thirty minutes in thermostat at 50°C;
  (iii) allow the solution to cool to ambient temperature and fill to the mark with methanol;
  (iv) mix thoroughly and place the flask in an ultrasonic bath for five minutes, then filter the solution through a 0.45µm filter membrane prior to analysis;
  (v) it gives a stock solution of 400 mg/liter; and
(i) prepare linearity point as specified in table below.-

Table

S. No.	Linearity Standard	concentration of stock solution (ppm)	volume (ml) of stock solution to be used	volume (ml) of methanol to be used	concentration of standard (mg/litre)
(i)	standard 1	400	0.20	0.80	80
(ii)	standard 2	400	0.40	0.60	160
(iii)	standard 3	400	0.60	0.40	240

(iv)	standard 4	400	0.80	0.20	320
(v)	standard 5	400	1.00	0.00	400

(j) Preparation of sample preparation.-

(i) thoroughly mix or stir products prior to sampling;

(ii) weigh 10 mg or sufficient sample to contain about 10mg of 28-Homobrassinolide into 25ml volumetric flask;

(iii) add 15ml of methanol to dissolve;

(iv) add 4ml phenylboronic acid solution and keep it for thirty minutes in thermostat at 50°C;

(v) allow the solution to cool to ambient temperature and fill to the mark with methanol; and

(vi) mix thoroughly and place the flask in an ultrasonic bath for five minutes, then filter the solution through a 0.45µm filter membrane prior to analysis.

41.3 Procedure.-

Perform HPLC analysis following conditions as specified in table below.-

Table

(i)	Column	C18 (150 mm x 4.6mm x 5 µ)
(ii)	Detector	UV
(iii)	Detecting wavelength	220 nm
(iv)	Flow rate	1.0 ml/ minute
(v)	Column temperature	25ºC
(vi)	Mobile phase	acetonitrile: water (80: 20)
(vii)	Run time	20 minutes
(viii)	Injection volume	10 µl

41.4 Calculation.-

$$f = \frac{\text{mass of 28-Homobrassinolide standard (mg) x purity of 28-Homobrassinolide standard (g/kg)}}{\text{peak areas of 28-Homobrassinolide in the calibration solution}}$$

$$\text{Content of 28-Homobrassinolide (g/kg)} = \frac{\text{peak areas of 28-Homobrassinolide in the sample solution x f}}{\text{mass of sample taken (mg)}}$$

41.5 Reference.-

CIPAC/5247/m 28-Homobrassinolide (June 2020).

42. Estimation of protein.-

(a) follow protocol detailed at Part B of Schedule II at Serial No. 3 for estimation of total nitrogen (in nitrate free samples); and

(b) total nitrogen estimated to be used for estimation of protein using the formula.-

$$\text{Protein (\%)} = \text{total nitrogen} \times 6.25$$

43. Estimation of vitamin-B3 (niacin).-

43.1. Equipment.-

(a) HPLC system with fluorescence detector.

(b) column - LiChrospher® 60 RP-18 (250 mm x 4.0 mm x 5 µm).

(c) 0.22µm syringe filter

43.2 Chemicals and Reagents preparation.-

(a) sodium acetate.

(b) potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4 .

(c) non stabilized hydrogen peroxide solution, H_2O_2 (30%).

(d) copper sulfate.
(e) acetic acid.
(f) concentrated hydrochloric acid solution.
(g) sodium hydroxide.
(h) nicotinic acid (CAS No 59-76-6).
(i) nicotinamide (CAS No 98- 92-0).
(j) water (HPLC grade).
(k) 0.1M hydrochloric acid solution: take a dried and cleaned 1000 ml volumetric flask and add 100 ml of water, add 8.3 ml of concentrated hydrochloric acid, make up the volume up to the mark with water and mix the solution thoroughly.
(l) copper sulfate solution, [Cu(II)SO4.5H2O], it should be suitable for dilution to prepare mobile phase.
(m) potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) solution, it should be suitable for dilution to prepare mobile phase.
(n) hydrogen peroxide solution (H_2O_2), it should be suitable for dilution to prepare mobile phase.
(o) 5M sodium hydroxide solution: dissolve 20 gram of sodium hydroxide in 80ml of water, after cooling dilute to 100 ml.
(p) preparation of nicotinic acid stock solution (1 mg/ml): dissolve nicotinic acid standard substance (100 mg) in water (100 ml), this solution is stable for one week at -18±1°C).
(q) **nicotinic acid(NA) and nicotinamide(NAM) standard solutions (0.05 - 5 µg/ml):** prepare first solution with 1 ml of each stock solution in 100 ml of water, and from this solution prepare four standard solutions (0.5 ml, 2.5 ml, 10 ml and 50 ml) in 100 ml of water, these solutions are stable for one day at room temperature.
(r) sample preparation:
  (i) vortex the sample (0.5- 2.0 gram) with 25 ml of 0.1M hydrochloric acid;
  (ii) heat the tubes for one hour in a boiling water bath;
  (iii) transfer the extracts into erlenmeyer flasks (250 mL), and add 20 ml of distilled H_2O and 4 ml of 5M sodium hydroxide, autoclave the flasks at 121± 1 °C for one hour;
  (iv) after cooling, adjust the pH of the extracts to 4.5 first with concentrated and then with dilute 0.1M hydrochloric acid; and
  (v) dilute the extracts to achieve 100 ml with distilled H_2O and filter into HPLC vials.

43.3 Procedure.-

(a) separate the niacin vitamers (NA and NAM) with a normal phase silica (HSS) T3 column (2.1 × 150 mm, 1.8 µm).
(b) perform the chromatographic separation at 30°C using an isocratic flow of the mobile phase (0.3 ml/minute) consisting of an optimized concentration of copper sulphate ($CuSO_4$, 5 µM) and hydrogen peroxide (H_2O_2, 150 mM) in a potassium phosphate buffer (70 mM of potassium dihydrogen phosphate; pH 4.5).
(c) expose the eluent flow from the column to a long-wavelength UV light (366 nm, 8 W) in a knitted PTEE reaction coil (1.59 mm o.d., 0.17 mm i.d. and 5 m length).
(d) detect NA and NAM fluorometrically (322 nm excitation and 380 nm emission wavelengths).
(e) inject the sample extracts (10 µl) in duplicate.
(f) HPLC Conditions to be followed as specified in table below.-

Table

(i)	column	normal phase silica (HSS) T3 column (2.1 × 150 mm, 1.8 µm).
(ii)	mobile phase	isocratic flow of the mobile phase, consisting of an optimized concentration of copper sulphate (5µM $CuSO_4$) and hydrogen peroxide (150mM H_2O_2) in a potassium phosphate buffer (70mM potassium dihydrogen phosphate, pH 4.5).
(iii)	sample injection	10 µl.
(iv)	retention time	3.6 minutes (for nicotinic acid). 10.6 minutes (for nicotinamide). (These may vary depending on the column phase and dimensions as well as mobile phase flow rate).
(v)	flow rate	0.3 ml/minute.

(vi)	temperature	30°C.
(vii)	run time	15 minutes.
Note: The level of detection for nicotinic acid and nicotinamide is 0.02 ng and 0.01 ng respectively, the level of quantification (3-fold the level of detection) for nicotinic acid and nicotinamide is 0.06 ng and 0.03 ng respectively.		

43.4 Calculation.-

The nicotinic acid and nicotinamide concentrations to be calculated using external calibration curves (calibration range: 0.2 - 20 ng).

43.5 Reference.-

Method for Determination of Niacin in foodstuffs, 2022 (FSSAI).

44. Method of analysis of Carrabiitol (Carrageenan oligosaccharide derivatives).-

44.1 Equipment.-

(a) HPLC CromSil LE PB + (8%) column (7.8 mm x 300 mm x 7µ) or USP L34- RPM monosaccharide PB (+) column.
(b) refractive index detector.
(c) analytical balance.
(d) ultrasonic bath.
(e) 0.22µ syringe filter.

44.2 Chemicals and Reagents.-

(a) water (HPLC grade).
(b) carrabiitol standard.
(c) preparation of carrabiitol standard solution: weigh carrabiitol (0.01 g) in a 10ml volumetric flask and make up the final volume with HPLC grade water and mix well.
(d) ultrasonicate solution for fifteen minutes and filter with 0.22µ syringe filter.

44.3 Procedure.-

Perform HPLC analysis following conditions as specified in table below.-

Table

(i)	Column	CromSil LE PB^+ (8%) column
(ii)	Detector	RI
(iii)	Detector temperature	35±2°C
(iv)	Flow rate	0.6 ml/minute
(v)	Column temperature	80±2°C
(vi)	Mobile phase	Water (HPLC grade)
(vii)	Run time	20 minutes
(viii)	Injection volume	10 µl
(ix)	Tri- Carrabiitol (Peak 1)	RRT: 1.75
(x)	Tetra- Carrabiitol (Peak 2)	RRT: 2.10
(xi)	Hexa- Carrabiitol (Peak 3)	RRT: 2.25
(xii)	Di- Carrabiitol (Peak 4)	Retention time: between 7- 8 minute

44.4 Calculation.-

(a) Carrabiitol Area (nRlU*s) for sample = Sum of all four peak Area (Peak 1 Area + Peak 2 Area + Peak 3 Area + Peak 4 Area); and
(b) Carrabiitol Area % for standard = Sum of all four peak Area (Peak 1 Area + Peak 2 Area + Peak 3 Area + Peak 4 Area).

$$\textbf{Total Carrabiitol (\%)} = \frac{\textbf{verage of Sample peak area x Standard. weight (g) x Dilution factor x Average of standard peak area}}{\textbf{Average of Standard peak area x Sample weight (gram)}}$$

44.5 Reference.-

MPTD/HPLC/2021/E01 18 (CSIR – National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, Microbial Processes and Technology Division).

45. Determination of Harpin-αβ.-

45.1. Equipment.-

(a) HPLC.
(b) ultrasonic Bath.
(c) analytical balances.
(d) laboratory glassware.
(e) freezer (-18°C).

45.2 Chemicals and Reagents preparation.-

(a) harpin αβ (CAS No. 917237-54-8) standard of known purity.
(b) acetonitrile.
(c) water.
(d) trifluoroacetic acid.
(e) calibration standard stock solutions: weigh 10 mg of harpin αβ and add to 50 ml volumetric flask, make the volume to 50 ml with mobile phase A.
(f) prepare the calibration solutions from calibration standard stock solution over approximately 50-150 µg/ml Harpin αβ in mobile phase A.
(g) sample solutions: approximately 1.0 gram sample to be diluted to 100 ml with mobile phase A (approximately 100 µg/ml Harpin αβ).

45.3 Chromatographic Conditions.-

(a) Perform HPLC analysis following conditions as specified in table below.-

Table

(i)	column	Zorbax 300SB-C8, 4.6 mm x 50 mm, 300 Ă, 5m USJK001535. (including a Zorbax 300SB C8 5 pm, 4.6 mm x 12.5 mm guard cartridge column).
(ii)	detection wavelength	218 nm.
(iii)	mobile phase	Mobile Phase A: 0.1% trifluoroacetic acid + 99.9% water (v/v). Mobile Phase B: 0.1% trifluoroacetic acid + 94.9% acetonitrile + 5% water (v/v).
(iv)	sample injection	(20 µL).
(v)	retention time	7.4 minutes.
(vi)	flow rate	1.5 ml/minute.
(vii)	temperature	50°C.

(b). mobile phase gradient as specified in table below to be followed during HPLC analysis.-

Table

S. No.	Time (Minutes)	% of Mobile Phase-B
(i)	0.0	44
(ii)	5.0	54
(iii)	8.0	66
(iv)	8.5	100
(v)	9.5	100
(vi)	9.75	44
(vii)	12	44

45.4 Calculation.-

$$\text{Harpin } \alpha\beta \text{ (mg/kilogram)} = \frac{\text{sample area x standard concentration x dilution}}{\text{standard area x sample weight}}$$

46. Determination of lactose.-

46.1 Equipment.-

(a) water bath.

(b) spectrophotometer.

46.2 Chemicals and Reagents Preparation.-

(a) Zinc Acetate - Phosphotungstic acid (ZAPT): dissolve 25.0 gram of zinc acetate and 12.5 gram of Phosphotungstic acid in water, 20 ml of glacial acetic acid is added and made up to 100 ml.

(b) Glycine-NaOH buffer: mix 150 ml of glycine solution containing 2.4768 gram of glycine and 1.9359 gram NaCl with 850 ml of 0.385 N NaOH to give pH of 12.8.

(c) Methylamine solution: dissolve 5.0 gram of methylamine HCl in distilled water and dilute to 100 ml and store in refrigerator.

(d) Sodium Sulphite solution 1% (w/v): dissolve 1.0 gram of sodium sulphite in distilled water and dilute to 100 ml, prepare fresh.

(e) 1N NaOH solution: dissolve 40 gram of NaOH in distilled water and make the volume to one litre.

(f) Standard Lactose solution:

(i) stock solution: dissolve 2.5315 gram of lactose monohydrate (USP grade) in 200 ml of 0.1 percent (W/V) benzoic acid and store in refrigerator; and

(ii) working solution: dilute 10, 15, 20, 25 and 30 ml of stock solution to 250 ml separately to get 0.5 to 1.5 mg of lactose per ml.

(g) Preparation of sample:

(i) to 8.0 gram of well mixed sample add 1 ml of ZAPT reagent, dilute to 10 ml, and after ten minutes filter using Whatman No. 1 filter paper; and

(ii) to 0.5 ml of the filtrate add 0.5 ml of NaOH solution, dilute to 10 ml and filter using Whatman No. 1 filter paper, dilute 5 ml of the filtrate to 10 ml.

46.3 Procedure.-

(a) preparation of standard curve and measurement in sample: Pipette 5 ml each of working standard lactose and unknown solution into 25 ml test tubes;

(b) add 5 ml of glycine NaOH buffer, 0.5 ml of methylamine solution and 0.5 ml of sodium sulphite solution in each tube, mix thoroughly;

(c) heat tubes in a thermostatically controlled water bath at 65°C for twenty five minutes and cool immediately in an ice water bath for two minutes to stop the reaction;

(d) read absorbance against blank at 540 nm in a spectrophotometer or a suitable spectrophotometer; and

(e) draw a standard curve by plotting absorbance against concentration of lactose and determine the concentration of lactose from it.

46.4 Reference.-

Nickerson et al. 1976. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. Journal Dairy Science 59, No 3, page 386".

[F.No. 3-5/2025-Biostimulants]

FRANKLIN L. KHOBUNG, Jt. Secy.

Note: The principal Order was published in the Gazette of India vide G.S.R. number 758(E), dated the 25th September, 1985 and was last amended vide S.O. dated 4441(E) dated 29th September, 2025.

Uploaded by Dte. of Printing at Government of India Press, Ring Road, Mayapuri, New Delhi-110064
and Published by the Controller of Publications, Delhi-110054.
SARVESH KUMAR SRIVASTAVA Digitally signed by SARVESH KUMAR SRIVASTAVA Date: 2025.10.06 22:52:09 +05'30'